

**MIKROPUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN
ZUR FUNKTION DES
JUXTAGLOMERULÄREN APPARATES**

Alfons Grüner

1974

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Direktoren: Prof.Dr.med. Kurt Kramer
Prof.Dr.med. Klaus Thureau

MIKROPUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DES
JUXTAGLOMERULÄREN APPARATES

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Alfons Grüner

aus

Bayreuth

1973



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr. K. Thureau

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof.Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 2. 1974

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A) Einleitung	1
B) Zur Frage der Funktion des JGA	14
1. Barorezeptor-Theorie	15
2. Die Rolle des sympathischen Nervensystems	18
3. Macula densa-Theorie	21
C) Material und Methoden bei der Funktions- untersuchung des JGA des Einzelneurons	55
D) Ergebnisse	61
E) Diskussion	66
F) Tabellen	73
G) Zusammenfassung	83
H) Anhang	84
1. Statistische Auswertung der Ergebnisse	84
2. Schrifttum	86

Abkürzungen

GFR = glomeruläre Filtrationsrate

JGA = juxtaglomerulärer Apparat

AK = Antikörper

ECV = extrazelluläres Volumen

HMV = Herzminutenvolumen

PAH = Paraaminohippursäure

A) Einleitung

1937 beschreibt Goormaghtigh den JGA der Niere (47, 48) unter Bezug auf eigene Arbeiten (46) sowie auf Arbeiten von Ruyter und Oberling (90, 85). 1933 hatte Zimmermann (126) ebenfalls bereits diese Formation bei einer Reihe von Säugern beschrieben, ausgehend von Ruyters Arbeit (90) und ihr den Namen "Polkissen" gegeben. Goormaghtigh stellt in dieser Untersuchung besonders zwei Punkte heraus, zunächst einen, der neu ist und ihm besonders wichtig erscheint: "Die Individualität dieser Zellgruppe am glomerulären Pol, deren Elemente sogar entlang der afferenten und efferenten Arteriole aufgereiht sind, beruht nicht nur einzig auf histologischen Gegebenheiten, sondern hauptsächlich auf besonderen Reaktionen unter pathologischen Bedingungen". So beschreibt er Zustände wie D-Hypervitaminose oder Scharlach, bei denen die glatten kontraktilen Muskelelemente der Nierenarteriolen atrophieren oder zugrunde gehen, während der neuro-myo-arterielle JGA intakt bleibt. Ebenso hypertrophiert dieser Apparat beim experimentellen Hochdruck des Hundes.

Zum zweiten beschreibt er die konstante Beziehung dieses Apparates zum Nierentubulus: "Stets auf der Ebene eines Nephrons besteht ein besonders enger Kontakt mit dem Gefäßpol des Glomerulus"..... Dieser Kontakt des Tubulusepithels war auch bereits von Zimmermann (126) beobachtet worden. Er nennt dieses epitheliale Segment "Macula densa" ohne zu versuchen, davon die funktionelle Bedeutung abzuleiten. Im weiteren schreibt Goormaghtigh: "Die Beständigkeit der beschriebenen Beziehungen hat ohne jeden Zweifel eine biologische Bedeutung Die beschriebene anatomische Einrichtung gestattet eventuell, daß die intraglomeruläre Zirkulation davon unterrichtet wird, was im entsprechenden Tubulus vor sich geht." -

Diese Idee Goormaghtighs wurde sowohl von ihm selbst (49, 50) sowie zunächst von anatomisch orientierten Forschern weiterverfolgt. 1945 setzt sich Schloß (91) in seiner Un-

tersuchung mit wohl allen bis dahin bekannten Unterlagen über Struktur und Funktion des JGA auseinander. Besonders die Arbeiten Goormaghtighs werden ausführlich diskutiert: "Ich kann anhand meiner Schnitte G. darin vollkommen bestätigen, daß am Gefäßpol im Winkel zwischen Arteriola afferens und Arteriola efferens (der Kürze wegen in dieser Arbeit Arteriolenwinkel genannt) regelmäßig eine auffällige Ansammlung von besonderen Zellen vorhanden ist. Die Basis des Arteriolenwinkels bildet die Macula densa, die sowohl dem Polkissen, als auch diesem dreieckigen, an kollagenen Fasern reichen Feld anliegt." - Zusammenfassend schreibt er weiter betreffend die Funktion des JGA, daß bei der vermuteten Kontraktion der Arteriola afferens die Muskelfasern in deren Wand eher beteiligt wären als die ebenfalls darin gelegenen epitheloiden Zellen. Die Funktion dieser Zellen bestünde sehr wahrscheinlich in einer Sekretion.

Damit war die Anatomie in lichtoptischen Bereichen geklärt. In neuerer Zeit versuchte Barajas (5, 6) unter Verwendung des Elektronenmikroskops mit dreidimensionaler Rekonstruktion von Serienschnitten die Beziehung der Strukturen des JGA weiter zu klären. Insbesondere ging es um die Frage des Kontakts zwischen dem distalen Tubulus mit dem Gefäßpol des Glomerulus. Barajas fand die Kontakte des Macula densa-Segments mit der afferenten wie auch der efferenten Arteriole inkonstant. Dagegen war das extraglomeruläre Mesangium in allen vier untersuchten JGAs in Kontakt mit dem distalen Tubulus. Weiterhin fand Barajas zwei Formen von Kontakt zwischen den beschriebenen Strukturen. Die eine hält er für permanent, die andere für reversibel. Aus diesen Befunden baute er eine Theorie für die Funktion des JGA auf, die diesen Wechsel des Kontakts zur Grundlage hat. Er schreibt der unterschiedlichen Intensität des Kontakts eine Vermittlerrolle bei der Übertragung des Einflusses des distalen Tubulus auf die gra-

nulierten Zellen zu. Dabei gelingt es ihm, sowohl die Macula densa- als auch die Barorezeptor-Theorie in seiner Hypothese zu integrieren.

Goormaghtigh postulierte schließlich - nicht zuletzt auf Grund seiner Beobachtung der Hypertrophie der JGAs beim experimentellen Hochdruck - daß diese Zellen verantwortlich für die Sekretion von Renin wären. Diese Feststellung wurde von einigen Autoren bestätigt (Kauffman und Bayless, 67), von anderen bestritten (Selye und Stoma, 97, Bohle, 15). In einer vergleichenden Untersuchung über das Vorkommen von epitheloiden Zellen in den Vasa afferentia von Mensch, Maus und Seewasserrfischen kamen Bohle und Walvig zu folgendem Ergebnis:

1. In den glomerulären und aglomerulären Nieren der aus acht verschiedenen Familien der Ordnung der Teleostier untersuchten Fische zeigten die Nierenarteriolen im Gegensatz zu der früheren Annahme einen epitheloidzelligen Aufbau ihrer Media.
2. Die epitheloiden Zellen der Teleostiernieren zeigen in ihrem Zytoplasma zahlreiche gut darstellbare Granula.
3. In der Wand der Nierenarteriolen des zur Ordnung der Elasmobranchier gehörenden *Acanthias vulgaris* RISSO konnten epitheloide Zellen nicht gezeigt werden.

Später fanden Sokabe et al. Renin in den von ihnen untersuchten Nieren verschiedener Süßwasser- und Seewasserteleostier sowie bei euryhalinen Fischen. Sokabe konnte auch eindeutig Epitheloidzellen mit Granula an der afferenten Arteriole der Niere von *Anguilla japonica* nachweisen.

Weitere Resultate von Kaplan und Friedman (66) konnten den Konflikt nur verstärken. In Untersuchungen an Fischen stellten sie fest (42), daß Extrakte aus Nieren

glomerulärer Fische (*Cyprinus carpio*) Renin enthielten, dagegen Extrakte aus aglomerulären Fischnieren (*Porichthys notatus*) nicht. Sie folgerten, daß Renin in den oder in der Nähe der Glomeruli produziert würde. Später jedoch fand man, daß aus glomerulären Nieren anderer Fische keine pressorischen Substanzen gewonnen werden konnten. In späteren Untersuchungen an fetalen Schweinenieren zeigte es sich, daß sie Renin enthielten, obwohl in ihnen noch keine juxtaglomerulären Zellen vorhanden waren. Darüberhinaus fanden sie, daß der Reningehalt proportional der Zahl der proximalen Tubuli des Mesonephros und Metanephros der Schweinefeten wäre. Sie glaubten ihre Hypothese in späteren Untersuchungen bestätigt (43), bei denen der Reningehalt in Kaninchennieren nach Tartratintoxikation zurückging, die ihrer Meinung nach selektiv die proximalen Tubuli schädigte. Diese Befunde konnten jedoch von späteren Untersuchern nicht reproduziert werden (15, 51, 81, 125): Der Reningehalt der Nieren nach Intoxikation war nicht vermindert und die Schädigung nicht an eine Struktur der Niere gebunden. Die entscheidende Untersuchung der Frage der Lokalisation von Renin wurde 1956 von Cook und Mitarbeitern (27) an Kaninchennieren durchgeführt. Sie teilten frische, gesunde Kaninchennieren durch tangential Schnitte von 15 - 20 μ Dicke in verschiedene Zonen. Sie stellten fünf wichtige Punkte fest:

1. Die aglomeruläre subkapsuläre Zone enthielt kein Renin.
2. Das meiste Renin befindet sich in der äußeren Rindenzone.
3. In der nächsttieferen Schicht des Cortex nimmt der Reningehalt ab, und zwar anscheinend parallel zur Zahl der Glomeruli, die anhand gefärbter Zwischenschnitte festgestellt wurden.

4. In der inneren marknahen Zone wurde eine Divergenz zwischen der Zahl der Glomeruli und dem Reningehalt deutlich: Das Renin sank bei gleicher Zahl der Glomeruli gegen NULL.
5. Der Reningehalt schwankte von Niere zu Niere erheblich.

Ganz klar wurde festgestellt, daß das Vorhandensein von Renin an das Vorhandensein von Glomeruli gebunden ist.

Untersuchungen von Bing und Wiberg (9) konnten das insofern bestätigen, daß auch sie die aglomeruläre Zone unter der Kapsel frei von Renin fanden sowie den Rückgang des Reningehalts parallel zur Verminderung der Glomeruli in den nächsten Schichten. Durch Messungen nach gezielten Zerstörungen bestimmter Strukturen mittels Mikrothermokoagulation stellten sie weiterhin fest, daß das Renin nicht in den Kapillarschlingen der Glomeruli enthalten sein könne. Jedoch fanden sie auch dann noch Renin in ihren Schnitten, wenn die Glomeruli samt Gefäßpol und Macula densa zerstört worden waren und schlossen daher auf das Vorkommen von Renin in tubulären Strukturen oder kleineren Gefäßen.

In einer weiteren Untersuchung (10) konnten die gleichen Autoren ihre Vermutung, daß die Glomerulusschlingen kein Renin enthielten, bestätigen. Die Isolierung der Glomerulusknäuel war mit einer leicht modifizierten Törnblom-Methode erfolgt (114). Aus der Tatsache, daß Renin in Gewebstückchen, die einerseits Glomeruli mit umliegendem Gewebe, dem juxtaglomerulären Komplex, enthielten sowie andererseits im restlichen Gewebe gefunden wurde, folgerete man, daß Renin nicht ausschließlich im JGA zu finden sei, obwohl die Reninkonzentration, die in den Glomerulus-JGA-Komplexen gefunden wurde, doppelt so hoch war.

Eine Bestätigung dieser Befunde waren die Ergebnisse von Cook und Pickering (28). Sie perfundierten Kaninchennie-

ren unmittelbar post mortem mit magnetischem Eisenoxid, um aus Cortexschnitten nach Passage durch ein 150 μ Sieb die magnetischen Glomeruli isolieren zu können. Sie stellten fest, daß die vorwiegend glomeruläre Fraktion stets mehr Renin enthielt als die vorwiegend tubuläre und die äußeren Glomeruli mehr Renin enthielten als die inneren und schließlich als wichtigstes (als Zufallsbefund), daß Glomeruli mit anhaftendem Gewebe viel mehr Renin enthielten als bloße Glomeruli. Sie folgerten somit, daß Renin in Zellen im oder nahe beim Glomerulus enthalten sein müsse und vermuteten, daß diese Zellen die epitheloiden Zellen in der Wand der Arteriola afferens sein könnten oder andere Zellen der besonderen Strukturen um den Glomerulus.

Bereits 1960 konnten Bing und Kazimierczak (11) mit einer kombinierten Feinschnitt-Mikrodissektionsmethode der Lokalisation von Renin ein Stück näher kommen: Sie präparierten unter mikroskopischer Kontrolle aus 100 μ dicken Nierenschnitten diejenigen Strukturen, die nach den bisherigen Untersuchungen als reninhaltig diskutiert wurden, und kamen zu folgenden Ergebnissen:

1. Teile aus der Umgebung des Glomerulus, und zwar inklusive der Bowman'schen Kapsel, die dem Gefäßpol gegenüberliegen, enthalten kein Renin.
2. Der Teil der Umgebung des Glomerulus, der den JGA und das Vas afferens enthält, besitzt nahezu die gleiche Reninmenge, die in der gesamten periglomerulären Umgebung und den Räumen zwischen den Glomeruli gefunden wird.

Die Tatsache, daß bei früheren Untersuchungen Renin in den Räumen zwischen den Glomeruli gefunden wurde, erklären die Autoren damit, daß solche Gewebstücke afferente Arteriolen von Glomeruli enthalten haben können, die in dem anschließenden Schnitt lagen.

3. Versuche der Isolierung von Vasa afferentia resultierten in einem Verlust von Renin, den die Autoren auf den Verlust von reninhaltigen perivaskulären Zellen zurückführen. Sie kamen also zu dem Schluß, daß Renin in Zellen der Macula densa oder anderen nahe der afferenten Arteriole gelegenen Zellen liegen müsse.

Tobian (110) und Gross (53) versuchten mit indirekten Methoden den Ort der Reninbildung festzulegen. Diese Studien lassen an eine enge Verknüpfung zwischen juxtaglomerulärer Granulation und Reningehalt denken als Hinweis darauf, daß Renin in den Teilen der Vasa afferentia gebildet und gelagert wird, die die Granula enthalten. Diese Ansicht, die mit den Folgerungen aus den zahlreichen Arbeiten Goormaghtighs (47, 49, 50) und Dunihue und Candons (40) übereinstimmt, wird bestärkt durch direkte Versuche von Hartroft und Edelman (57), bei denen gefunden wurde, daß fluoreszierende Antikörper gegen eine gereinigte, aber nicht ganz reine Reninpräparation die juxtaglomerulären Granula anfärben.

Anknüpfend an die Arbeit von 1960 (11) versuchten Bing und Kazimierczak erneut (12), mit einer verfeinerten Mikrodissektionstechnik die Lokalisation von Renin in der Niere zu klären. In Präparationen, die einmal Glomeruli mit afferenten Arteriolen, dann zusätzlich mit der nahe dem distalen Ende der Arteria afferens gelegenen Macula densa und schließlich mit einem Gewebsblock, der auch noch andere tubuläre Elemente perivaskulär enthielt, aufwiesen, bestimmten sie den Reningehalt. Sie fanden 50 - 90% des Renins in der Präparation, die den Teil des distalen Tubulus mit der Macula densa enthielt. Einen kleineren Teil des Renins fanden sie in den Gefäßpräparaten, nämlich 10 - 50%. Dieses Ergebnis zusammen mit der Tatsache, daß sie, wie vor ihnen schon Kaplan und Friedman (66), in der subkapsulären Zone der Niere neugeborener Schweine Renin fanden, führte sie zu dem Schluß, daß Re-

nin in der Macula densa gebildet und zu einem gewissen Teil in der afferenten Arteriole gelagert wird. (Die subkapsuläre Zone in der Niere neugeborener Tiere enthält unreife Glomeruli und Nephronen, die keine färbbaren Granula aufweisen, während tiefere Schichten nachweisbare Granula in den afferenten Arteriolen enthalten).

1964 schließlich gelang der Nachweis der Lokalisation von Renin in den juxtaglomerulären Zellen mit Hilfe der fluoreszierenden Antikörpertechnik (59) durch Hartroft et al. Der erste Versuch der Applikation von Antikörpern zum Nachweis von Renin war von Nairn, Fraser und Chadwick (84) unternommen worden. Sie fanden eine spezifische Anfärbung des glomerulären Knäuels und schlossen daraus, daß Renin nicht von den juxtaglomerulären Zellen sezerniert würde. Der Grund für dieses abweichende Ergebnis liegt einmal in der Verwendung der sandwich-Technik, die zwar eine bessere Färbung, jedoch auch Anlaß zu mehr unspezifischer und sog. background-Färbung gibt und zum anderen in der Verwendung nicht ganz reiner Reninextrakte zur Herstellung der Antikörper.

Später gelang es Edelman (54, 58) mit Hilfe einer einfachen Antikörpertechnik, histologisch den Ort der Reninbildung zu bestimmen: Er fand eine Färbung ausschließlich in den juxtaglomerulären Zellen. Die Färbung der glomerulären Kapillaren gelang nur bei Verwendung der genannten sandwich-Technik, hielt jedoch bei Blockerversuchen nicht stand. 1964 konnten diese Ergebnisse bei Versuchen mit Renin-Antikörpern, deren hohe Spezifität bei Vorversuchen getestet war, voll bestätigt werden. (Kreuzreaktionen der Fähigkeit des Antikörpers, die pressorische Aktivität von Renin zu blockieren, Blockierung der Färbung von juxtaglomerulären Zellen von Kaninchen nach Vorinkubation des Anti-Schweinerenin mit Hunderenin, wobei etwaige unspezifische Färbungen nicht blok-

kiert, also sichtbar wären).

Darüberhinaus konnten die Autoren die strittige Frage des Vorkommens von Renin in fetalen und neugeborenen Nieren klären. Sie konnten nämlich zeigen, daß auch diese Nieren juxtaglomeruläre Zellen enthielten, die man zuvor, vermutlich wegen ihrer wesentlich geringeren Grösse, nicht gesehen hatte. Auch im Mesonephros von Fischen konnten juxtaglomeruläre Zellen sowohl mit der herkömmlichen Bowie-Färbung wie auch mit der neueren Antikörpertechnik nachgewiesen werden. In beiden Fällen sind die juxtaglomerulären Zellen deutlich arterioläre Komponenten und getrennt von der Macula densa, der anderen Hauptkomponente des JGA.

Die gleiche Arbeit enthält bereits den Schritt zur Untersuchung der Funktion des Renin-Angiotensin-Systems. Die Autoren prüften den Effekt des durch aktive Immunisierung entstandenen Antireninins wie auch die Wirkung von verabreichtem Antirenin. Sie fanden in Übereinstimmung mit Schmid und Graham (92) bei Hunden nach Immunisierung mit Schweinerenin verbunden mit hohen Antirenin-Titern Hyperplasie und Hypergranulierung der juxtaglomerulären Zellen. Bei ansonsten normalen Hunden hatte die aktive Immunisierung mit Schweinerenin keinen deutlichen Effekt auf Blutdruck, Natriumausscheidung und Nebennierenrinde trotz hoher Antirenin-Titer. Die passive Verabreichung von Antirenin an natriumarme Hunde blockierte die Natriumretention als ein Zeichen für die Bedeutung des Renin-Angiotensin II-Systems für die Behandlung des Natriums in der Niere.

Die folgende Gruppe von Arbeiten befaßt sich mit dem Nachweis von Renin bzw. Angiotensin in verschiedenen Körperflüssigkeiten oder Geweben und der Entwicklung immer feinerer Methoden bis hin zum Nachweis in einzelnen JGAs. In diesen Arbeiten wird auch bereits die Änderung des Re-

ningehalts der erwähnten Medien unter bestimmten Bedingungen untersucht.

So untersuchten 1961 Lever und Peart (73) die Lymphe von Hunden auf pressorische Aktivitäten. Dieser Nachweis geschah sowohl mit einer direkten wie mit einer indirekten Methode. Beim direkten Nachweis wurde narkotisierten und Pentolinium-behandelten Ratten die gewonnene Lymphe ohne Vorinkubation direkt injiziert. Dies gilt als Nachweis insbesondere für Renin, da das in der Injektion enthaltene Renin mit dem Plasma der Testratte reagiert und eine Blutdruckantwort gibt. Als Standard diente die Injektion von Hunderenin, die jeweils vor und nach einer Testinjektion erfolgte.

Beim indirekten Nachweis wurde die Lymphe 20 min mit Hundeflasma als Substrat bei 37° C inkubiert (0.5 ml Lymphe pro 0.5 ml Substrat). Proben des Inkubats wurden wiederum Ratten injiziert und mit dem Effekt von Standard i.v. Dosen von Hypertensin (Ciba) verglichen.

Die Autoren fanden an einem relativ großen Material, daß bei nicht renaler Lymphe in keinem Fall ein pressorischer Effekt gefunden wurde bzw. die Standard-Reninlösung pro ml Lymphe unter der Nachweisgrenze von 0.025 ml lag; die Mehrheit der renalen Proben lag darüber. Auch beim indirekten Nachweis zeigte sich dieses Ergebnis (Nachweisgrenze hierbei 0.01 µg Angiotensin pro ml). Ebenso fielen bei beiden Methoden eine Anzahl Proben sowohl renaler wie Ductus thoracicus-Lymphe unter die Nachweisgrenze. Daraufhin wurden mehrere dieser Proben 5 - 20fach konzentriert ebenso wie einige andere Lymphproben nicht renalen Ursprungs. Nach diesem Vorgehen lagen alle renalen und Ductus thoracicus-Proben über der Grenze, wogegen alle nicht renalen Proben wie vorher darunter lagen. Weiterhin wurde Ductus thoracicus-Lymphe vor und nach Nephrektomie gemessen, wobei sich im letzteren Falle auch

nach Konzentrierung kein Effekt mehr zeigte. Als Nebenfund ergab sich, daß nach Entfernung beider Nieren der Fluß im Ductus thoracicus auf etwa 50% des Ausgangswertes fiel (auch bei vorangegangener Evisceration). Das Anlegen einer einseitigen Nierenarterienstenose hatte in 6 von 15 Fällen einen starken Anstieg der pressorischen Wirkung der Lymphe dieser Seite zur Folge, nicht jedoch auf der unbehandelten Seite. Zum Ausschluß eines Konzentrierungseffekts infolge der Stenose (obwohl sich der Lymphfluß durch die Stenose gewöhnlich nicht änderte) wurde die totale Eiweißkonzentration (als Gesamt-N) bestimmt und unverändert gefunden. Bei 4 Fällen war kein Anstieg, bei den restlichen 5 nur ein leichter gefunden worden. Da bei 3 der mit nicht angestiegenem und 2 der mit mäßig angestiegenem Renin verbundenen Stenosen eine mehr als 1 Stunde dauernde Anurie aufgetreten war, jedoch in keinem der Fälle mit deutlichem Anstieg, schlossen die Autoren, daß eine leichte Ischämie eher zu einem Anstieg führte als eine extreme Drosselung. Interessanterweise konnten die Autoren eine ähnliche pressorische Aktivität in Nierenvenenblut vor und nach Stenose nicht finden, obwohl andererseits keine Konzentrierung vorgenommen wurde. Daß es sich bei der pressorischen Aktivität um Renin gehandelt hatte, schlossen die Autoren aus deren Verhalten bei mehreren biochemischen und pharmakologischen Versuchen, bei denen sich gegenüber Hunderenin keine Unterschiede zeigen ließen.

Die Arbeitsgruppe um Brown untersuchte später den Renin Gehalt einzelnere Glomeruli vom Kaninchen (20). Sie fanden in den juxtamedullären Glomeruli kein oder sehr wenig Renin und einen steigenden Reningehalt in den Glomeruli entlang der Arteria interlobaris bis hinauf zu den oberflächlichsten Glomeruli. (Bei unseren eigenen späteren Untersuchungen an der Kaninchenniere kamen wir zum gleichen Ergebnis.) Diese Zunahme des Renins ging parallel

zu histologisch faßbaren Veränderungen der Strukturen des JGA, am deutlichsten zum juxtaglomerulären Granulationsindex. An dieser Stelle sei noch eine Arbeit von Devenyi, Dauda und Szabo erwähnt (36), die die Beziehung zwischen juxtaglomerulärem Index und der Aktivität des Renin-Angiotensin II-Systems untersuchten. Sie fanden nach Adrenalectomie eine starke Diskrepanz zwischen dem juxtaglomerulären Index, der nahezu normal war, und dem histologischen Bild des JGA, der alle Zeichen aktiver Sekretion zeigte sowie starke Hyperplasie. Nach Abklemmen einer Nierenarterie gingen die beiden Veränderungen parallel. Die Autoren schlossen daraus, daß der juxtaglomeruläre Index nicht unbedingt den Aktivitätszustand des JGA spiegelt, und daß dieser nur aus der gleichzeitigen Untersuchung der Morphologie des JGA ermittelt werden kann.

Zum gleichen Ergebnis kam auch Eckert (41) anlässlich einer Untersuchung des erythropoetischen Systems der Niere.

Weniger deutlich war ein Zusammenhang mit dem Färbeverhalten der Macula densa. Gavras et al. (44) untersuchten den Reningehalt einzelner Glomeruli des Kaninchens unter Kochsalzbelastung bzw. -entzug. Sie fanden im ersteren Fall eine allgemeine Verminderung des glomerulären Renins und in den natriumverarmten Tieren einen Anstieg im Reningehalt sowohl in den tiefen wie in den oberflächlichen Glomeruli. Sie verglichen diese Ergebnisse mit Befunden, die 1966 von Brown et al. (21) nach Anlegen einer einseitigen Nierenarterienklemme erhoben worden waren: In der poststenotischen Niere war der Reningehalt in den oberflächlichen und tiefen Glomeruli erhöht, während die gesunde Niere alles Renin verloren hatte, sogar in den oberflächlichsten Glomeruli. Horster und Thureau (64) fanden bei Mikropunktionsuntersuchungen, daß unter Natriumentzug das gesamte GFR erniedrigt war sowie das Einzel-

filtrat der oberflächlichen Nephronen, während das Einzelfiltrat der juxtamedullären Nephronen gestiegen war. Unter hoher Natriumdiät zeigte sich ein Anstieg des Gesamt-GFR sowie des oberflächlichen Einzelfiltrats, während das Einzelfiltrat der juxtamedullären Glomeruli erniedrigt war. Gavras diskutiert verschiedene Möglichkeiten, die das unterschiedliche Ergebnis bedingen könnten; so könnte etwa ein vom Reninsystem unabhängiger Mechanismus im Spiel sein, oder bei den beiden Methoden könnte es sich um unterschiedliche Nephronen bei "oberflächlich" und "tief" gehandelt haben usw. Auch fand sich bei den Kaninchen mit natriumreicher Diät ein signifikant höherer Blutdruck, was von Horster und Thureau nicht beobachtet worden war. Den wichtigsten Unterschied jedoch, daß es sich nämlich um verschiedene Tierspezies handelt, läßt Gavras außer acht. Wie von Granger, Dahlheim und Thureau später gezeigt wurde, existiert bei der Ratte nämlich kein Unterschied zwischen tiefen und oberflächlichen Glomeruli unter Normaldiät (52), unter natriumreicher Nahrung sinkt der Reningehalt in beiden Gruppen auf etwa die Hälfte und unter Kochsalzentzug steigt der Reningehalt auf gut den doppelten normalen Wert. In diesem Fall zeigt sich auch ein geringer, statistisch jedoch nicht signifikanter Unterschied der beiden Gruppen, wobei die oberflächlichen Glomeruli etwas höher im Reningehalt liegen.

B) Zur Frage der Funktion des JGA der Niere

Seit Goormaghtigh (46 - 50) die Beziehung zwischen JGA und Renin beschrieb, befaßte sich eine große Anzahl von Untersuchern mit der Erforschung dieser Parameter sowie ihres Verhaltens unter den verschiedenartigsten pathologischen und experimentellen Bedingungen bzw. ihrer physiologischen Funktion.

Goormaghtigh beschrieb sehr klar (48) die charakteristischen Änderungen des JGA des Nephrons bei einseitigen renovasculärem Hochdruck, nämlich Hyperplasie und Hypergranulierung der epitheloiden Zellen in der Wand der afferenten Arteriole der stenosierten Niere. Diese Befunde wurden dann von zahlreichen Autoren bestätigt (40, 56, 109).

Nachdem es Goldblatt und anderen gelungen war, durch eine teilweise Konstriktion der Nierenarterie renalen Hochdruck zu erzeugen (18, 87, 45), glaubte man, daß eine renale Ischämie der Stimulus für eine Reninsekretion wäre. Es konnte aber schon bald gezeigt werden, daß eine renale Ischämie nicht eine notwendige Voraussetzung für eine Reninabgabe darstellt (65, 37, 98, 99, 117). Mit dieser Erkenntnis bildeten sich neue Theorien heraus, und die meisten Untersucher betonten immer mehr zwei mögliche Mechanismen als Renin-Stimuli, zum einen die Rolle eines intrarenalen Baroreceptors und zum zweiten die Rolle der Macula densa als Kontrollorgan hauptsächlich tubulärer Parameter. Mit diesen beiden Hypothesen war es möglich, eine große Anzahl experimenteller Befunde zu erklären, so daß sich die Mehrzahl aller Arbeiten um die Beweisführung für die eine oder andere Theorie bemüht. Gemeinsam ist beiden Ansichten, daß erstmals rein intrarenale Änderungen die Hauptrolle bei der Kontrolle der Reninabgabe durch die Niere spielen. Erst in neuerer Zeit ergab sich als Folge der bei verschiedenen Versuchen festge-

stellten Beziehungen zwischen Salz-Wasserhaushalt und den damit verbundenen Hormonen einerseits und dem Renin-Angiotensin-System andererseits die Möglichkeit einer Rolle von extrarenalen Volumenrezeptoren, die über das sympathische Nervensystem bzw. dessen Hormone einen mittelbaren Einfluß über die obengenannten intrarenalen Kontrollmechanismen ausüben, z.B. durch eine Beeinflussung deren Ansprechbarkeit, wie auch eine unmittelbare eigenständige Funktion vegetativer Nierenerven bei der Regulation der Reninsekretion vorliegen könnte.

Im folgenden Abschnitt wird es um die Darstellung der Ergebnisse von Arbeiten gehen, die Argumente für oder gegen diese Theorien liefern.

1. Barorezeptor-Theorie

Seit den ersten Untersuchungen durch Kohlstaedt und Page (68) zur Frage des Einflusses zirkulatorischer Faktoren auf die Reninabgabe war die Frage offen, welcher Kreislaufparameter die entscheidende Rolle spielen soll, ob Mitteldruck oder Amplitudenschwankungen. In einer subtilen Untersuchung wurde von Skinner et al. (98) in Nierenvenen- bzw. arteriellem Blut der Gehalt an pressorischer Aktivität unter graduierter Aortenkonstriktion gemessen. Bei verminderter Blutdruckamplitude konnte keine Änderung der Reninabgabe festgestellt werden, wohl aber bei sehr geringer (10 mmHg) Abnahme des Mitteldrucks der Nierenarterie. Selbst wenn die Blutdruckschwankung (Amplitude) praktisch nicht mehr vorhanden war bei unverändertem Mitteldruck (was durch eine Kombination von Aortenkonstriktion und Vagotomie erreicht wurde), konnte keine Stimulation der Reninsekretion erzielt werden.

Eine Kombination aus reduziertem Mitteldruck und grösserer Amplitude, was durch die Gabe von Ganglienblockern und Reizung eines peripheren Vagusastes erzielt

wurde, resultierte in einer erhöhten Reninabgabe. Weitere Befunde gegen die Amplitudenschwankung finden sich bei Davis et al. (31), die erhöhte Reninkonzentrationen in peripherem und Nierenvenenblut fanden trotz erhöhter Amplitude bei einer Aorten-vena cava-Fistel als Grund für ein high output failure, bei dem der Mitteldruck erniedrigt ist. Diese Befunde reichten aus, die Amplitude als Renin-bestimmenden Faktor zu verlassen.

Schon 1946 war das Konzept des mitteldruckempfindlichen renalen Druckrezeptors entworfen worden (18), jedoch in neuerer Zeit wurde es hauptsächlich von Tobian weiterverfolgt (110, 112). Er postulierte, daß die juxtaglomerulären granulierten Zellen den gleichen Änderungen unterworfen sind wie die Wand der afferenten Arteriole, in der sie ja liegen, und somit als Dehnungsrezeptoren fungieren könnten. Dabei sollte ein erhöhter Blutdruck diese Zellen dehnen und eine Reninabgabe verhindern, während ein Blutdruckabfall umgekehrt wirksam wäre. Damit würde auch der Ausfall der Amplitude als bestimmender Faktor korrelieren, da anzunehmen ist, daß der arterielle Puls bis zu Erreichen des JGA erheblich gedämpft ist.

In einer umfassenden Arbeit über die Zusammenhänge zwischen Elektrolytbilanz, juxtaglomerulären Zellen und Hochdruck (110) beschreibt Tobian eine Untersuchung an der isolierten Niere, bei der es nicht gelang, den Granulationsindex durch eine 2 - 3stündige Perfusion mit bis zu 180 meq/l Na enthaltendem Blut zu beeinflussen. Dagegen konnte der Granulationsindex bei einer gleich langen Perfusion mit Blut von normalem Natriumgehalt unter erhöhtem Druck deutlich gesenkt werden (109). Ausgehend von diesem Befund wendet er seine Barorezeptor-Theorie der juxtaglomerulären

Zellen auch auf andere, länger bekannte Befunde an und erklärt z.B. die Änderung des Granulationsindex unter hoher und niederer Kochsalzdiät über die Änderung des ECV und des Blutvolumens mit nachfolgender Beeinflussung des Spannungszustandes auch der afferenten Arteriole. Als weitere Argumente führt Tobian Versuche an, bei denen Klemmen an eine Nierenarterie angelegt wurden und in dieser sowie in der kontralateralen Niere der Granulationsindex bestimmt wurde. Dabei steigt der Granulationsindex in der ischämischen Niere erheblich, während er in der unberührten Niere stark absinkt. Wird deren Arterie auch geklemmt, so kommt es dort ebenfalls zum Anstieg des Granulationsindex (108). Wird bei einer hypertensiven Ratte mit einer ischämischen und einer normalen Niere die ischämische relativ frühzeitig entfernt, so kommt es zum Wiederauftreten von Granula in der vorher praktisch "leeren" kontralateralen Niere. In einer späteren Arbeit (112) faßt Tobian schließlich nochmals alle Zustände zusammen, die über eine Dehnungsänderung der Wand der afferenten Arteriole zu einer Änderung des Granulationsindex führen sollen, wie Nebennieren-Insuffizienz, Schock, niedrige Kochsalzdiät, Heilung eines renalen Hochdrucks durch Entfernung einer ischämischen Niere, Abklemmen der Arterie einer Niere, deren kontralaterale Niere bereits ischämisch war und chronische Verabreichung von Chlorothiazid (111) als Ursachen für eine Hypergranulierung. Andererseits nennt er als Ursachen für eine Abnahme des Granulationsindex die Applikation von DOCA und Kochsalz, hohe Kochsalzdiät. Ferner wird ein erniedrigter Granulationsindex beobachtet in der kontralateralen Niere einer ischämischen Niere, in isolierten Nieren, die mit erhöhtem Druck perfundiert wurden und nach Anwendung des Sympathonimetikums Naphazolin-HCl.

Aus all diesen Befunden, die sich in der Barorezeptor-Theorie unterbringen lassen, postulierte Tobian die juxtaglomerulären Zellen als Dehnungsrezeptoren.

In letzter Zeit wurde eine Untersuchung von Blaine et al. durchgeführt (13), bei der das Modell der nichtfiltrierenden Niere benutzt wurde, um zu zeigen, daß die Reninabgabe stimulierbar wäre auch ohne die Mitwirkung der Filtration, was von den Autoren mit einer Ausschaltung der Macula densa gleichgesetzt wurde. Der Filtrationsstop wurde durch die Kombination von 2stündiger Nierenischämie mit Ureterligatur erreicht, evtl. noch in Verbindung mit Denervierung allein oder zusätzlich mit Adrenalektomie. Es wurde gezeigt, daß die Plasmareninaktivität 30, 60 und 90 min nach Hämorrhagie anstieg ebenso wie nach Anlegen einer Aortenklemme. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, daß ein im Nierengefäßsystem liegender Mechanismus für die Reninkontrolle verantwortlich wäre, der unabhängig von der Natriumkonzentration an der Macula densa, den Nierennerven oder der Adrenalinausschüttung aus dem Nebennierenmark wäre. Dabei muß jedoch bedacht werden, daß ein Vergleich mit unter physiologischen Bedingungen erhaltenen Werten nicht unmittelbar möglich ist, da es sich um zwei völlig unterschiedliche Empfindlichkeitsbereiche handelt.

2. Die Rolle des sympathischen Nervensystems (1)

In neuerer Zeit häufen sich Untersuchungen, bei denen die Kontrolle des autonomen Nervensystems über die Reninabgabe im Mittelpunkt steht. 1964 berichtete Taquini (101), daß die Denervierung einer Niere bei der Ratte den Reningehalt dieser Niere im Vergleich zur kontralateralen vermindere. Spätere Befunde von Tobian et al. (113) bestätigten dies. Sie fanden eine

Verminderung des Granulationsindex um 40% in der denervierten Niere. Vander (118) zeigte an Hunden, daß direkte elektrische Reizung der Nierennerven eine erhöhte Reninabgabe verursachte. Das gleiche konnte in dieser Untersuchung erreicht werden durch i.v. Infusion von Adrenalin oder Noradrenalin, wobei der Druck in der Arteria renalis durch eine Aortenklemme konstant gehalten wurde. Skornik und Paladini (100) berichteten schon 1964, daß Noradrenalin, 2 - 4 µg/kg/min, eine Zunahme des Blut-Angiotensinspiegels bei Hunden verursachte, und daß diese Antwort noch verstärkt wurde, wenn der Druckeffekt des Noradrenalins auf Nierenebene durch eine Aortenkonstriktion blockiert wurde. Wathen et al. (122) und Bunag et al. (23) beobachteten, daß Infusionen von Katecholaminen direkt in die Nierenarterie einen Anstieg der Reninabgabe auslöste. I.v. Gaben von pressorischen Dosen verfehlten jedoch diese Wirkung. Schließlich zeigten Bunag et al., daß die Reninabgabe durch Infusion von Tyramin und DMPP (Dimethylphenylpiperazin) direkt in die Nierenarterie stimuliert werden konnte. Otsuka (86) fand, daß i.v. Applikation von Adrenalin einen signifikanten Anstieg der Plasma-Reninaktivität bei Hunden zur Folge hatte trotz eines Anstiegs des Blutdrucks. Auch kleinere Dosen (0.27 µg/kg/min), die keinen Blutdruckanstieg bewirkten, stimulierten die Reninsekretion. Die ersteren Dosen entsprachen der maximalen Adrenalin-ausschüttung während Hypoglykämie, während die letzteren der mittleren Ausschüttung entsprachen. Noradrenalin 0.6 µg/kg/min hatte keinen meßbaren Effekt. Das stimmte mit den zitierten Befunden von Wathen et al. überein, die geringfügig höhere Dosen verwendet hatten. Ueda et al. (115) und Maebashi et al. (77) beobachteten einen Anstieg der Plasma-Reninaktivität bei Hunden nach i.v. Verabreichung von Noradrenalin, ohne

gleichzeitige Aortenklamme, aber sie verwendeten sehr große Dosen. Die gleichen Autoren fanden einen Adrenalineffekt nur, wenn die Tiere mit β -Blockern vorbehandelt waren. Über einen Anstieg der Reninsekretion beim Menschen nach Noradrenalin wurde ebenfalls berichtet (25, 26, 62). Weitere Argumente für die Möglichkeit der Beeinflussung der Reninsekretion durch das autonome Nervensystem liefern Studien mit Insulin-induzierter Hypoglykämie, einem Zustand, der mit deutlicher Noradrenalinsekretion einhergeht, jedoch nur geringer Blutdruckänderung. Otsuka hatte in der zitierten Arbeit dieses Modell verwendet. Er hatte auch den Abfall des Plasma-Kaliums durch i.v. Infusion von KCl ausgeglichen, da ein erniedrigtes Plasma-Kalium ebenfalls Reninsekretion stimulieren soll (120, 78). Renale Denervierung konnte die Reninantwort nicht beeinflussen, jedoch eine Denervierung des Nebennierenmarks bewirkte eine starke Abschwächung. Somit scheint in erster Linie eine Erhöhung des zirkulierenden Adrenalins für den Effekt verantwortlich zu sein, umso mehr, als dieser durch Propranolol blockierbar ist.

In einer späteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe (75) wurde schließlich gefunden, daß bei direkter Nierennervenreizung nach Propranolol kein Plasma-Reninaktivitätsanstieg auftrat. Nach Gabe des α -Blockers Phenoxybenzamin fiel der Blutdruck und die Plasma-Reninaktivität stieg. Jedoch nach Gabe von Propranolol und Phenoxybenzamin trat kein Plasma-Reninaktivitätsanstieg auf, obwohl der Blutdruck in gleicher Weise fiel. Zusätzliche Reizung der Nierennerven hatte eine Verstärkung beider Effekte zur Folge. Daraus folgerten die Autoren, daß Nierennervenreizung und α -Blockade die Reninsekretion über einen β -Rezeptor erhöhen. Reizung der Nierennerven erhöhte den systolischen und diastolischen Blutdruck, was durch β -Blockade unbe-

einflußt blieb, durch α -Blockade jedoch abgeschwächt wurde. Die Messung der Plasma-Reninaktivität erfolgte über Immunoassay und Bioassay, wobei der Immunoassay etwas höhere Werte ergab als der Bioassay, wie es schon in anderen Versuchsserien der gleichen Autoren der Fall war. Die relativen Änderungen innerhalb der einzelnen Methoden sind jedoch vergleichbar und beruhen auf der unterschiedlichen Testmethode (Stockigt und Ganong, unveröffentlichte Beobachtungen). Auch Menard und Catt (80) fanden im Radioimmunoassay für die Plasma-Reninaktivität und Plasma-Reninkonzentration etwas höhere Angiotensin I-Werte als in früheren Untersuchungen im Bioassay, führten das aber auf verbesserte Inkubationsmethoden zurück. Voraussetzung für die Wirksamkeit adrenerger Nerven war deren anatomischer Nachweis am JGA, wie er schon 1966 von Biava und West (8) begonnen worden war und in späteren Arbeiten gesichert wurde (60, 4, 121).

All diese Daten sprechen stark für eine Rolle des sympathischen Nervensystems bei der Regulation der Reninsekretion, und zwar auf zwei Wegen: Über die zirkulierenden Katecholamine und die Nierenerven. Darüber hinaus scheint ein β -adrenerger Rezeptor die Wirkung zu vermitteln. Somit bleiben zwei Fragen zu beantworten: 1. Unter welchen Bedingungen mit erhöhter Reninsekretion spielt der Sympathikus eine Rolle? und 2. Über welchen Mechanismus erhöhen die Katecholamine die Reninsekretion?

3. Macula densa-Theorie

Ausgehend von der Anatomie gab bereits Goormaghtigh der Meinung Ausdruck, daß diese enge Verbindung zwischen dem Glomerulus eines Nephrons und dem dazugehörigen distalen Tubulus im JGA eine Funktion haben müsse. Jedoch ist es bis zum heutigen Tag nicht ge-

lungen, die Meinungsverschiedenheiten eben um die physiologische Funktion dieser Strukturen zu beseitigen.

Es scheint aber in neuerer Zeit eine immer größere Gruppe von Autoren der Ansicht zu sein, daß es primär intrarenale Faktoren sind, die die Reninsekretion steuern. Immer mehr scheint sich auch die Meinung zu verbreiten, daß diese Kontrolle auf der Ebene einer Funktionseinheit der Niere erfolgt, wobei die führende Rolle der Macula densa als Rezeptor der tubulären Funktion mit nachfolgender Steuerung der zugehörigen Reninhaltigen Zellen zukommt.

Die im folgenden zu besprechenden Arbeiten werden sich mit Untersuchungen befassen, bei denen die Klärung der Funktion der Macula densa im Vordergrund steht.

1964 fand Vander (117) im Nierenvenenplasma normaler Hunde in 85% pressorische Aktivität. Sie verhielt sich umgekehrt proportional zur Natriumausscheidung und stand in keiner Beziehung zum arteriellen Blutdruck. Eine Reduzierung des mittleren Nierenarteriendrucks auf 90 mmHg mittels einer Aortenklemme verminderte die Natriumausscheidung und erzeugte eine anhaltende Erhöhung der Reninsekretion und des arteriellen Blutdrucks proximal der Klemme. Lösung der Aortenklemme führte zur Normalisierung dieser Parameter. Induktion einer Diurese vor Anlegen der Klemme (osmotisch, Chlo-rothiazid oder Azetazolamid) schwächte den Renin- sowie den Blutdruckanstieg proximal der Klemme stark ab oder verhinderte ihn. Induktion einer Diurese während Abklemmung der Aorta brachte das erhöhte Renin sowie den erhöhten Blutdruck auf Kontrollwerte. Diese Effekte lassen sich nicht mit Änderungen der Nierenhämodynamik oder Plasmazusammensetzung erklären. Eine Erhöhung des Ureterdrucks bei anurischen Hunden erhöhte ebenfalls die Reninsekretion sowie den arteriellen

Blutdruck. Vander schloß aus diesen Fakten, daß die Reninsekretion nicht vom Blutdruck oder dem intrarenalen Druck kontrolliert würde, sondern vom Fluß oder der Zusammensetzung der intratubulären Flüssigkeit, möglicherweise auf der Ebene der Macula densa. 1966 wollten Bunag et al. (24) untersuchen, ob eine Senkung des Blutdrucks mittels Natrium-Nitroprussid den gleichen Effekt auf die Reninausschüttung hat wie eine mechanische durch Aortenkonstriktion. Das Ergebnis war völlig irregulär und verschieden von Tier zu Tier. Angeregt durch die zitierte Arbeit Vanders, in der die Rolle des Natriums diskutiert wird, gingen die Autoren dazu über, vor und während der Infusion von Nitroprussid die Natriumausscheidung zu messen. Wenn die anfängliche Natriumausscheidung groß war, bewirkte das Nitroprussid keine Reninfreisetzung und umgekehrt; wenn die Natriumausscheidung zu Beginn klein war, erfolgte eine Stimulierung. Schließlich wurden die Versuche ausgedehnt auf die Frage, ob auch andere Reize, die bekanntermaßen zur Reninabgabe führen, unter dem Einfluß des Natriums stehen. An Hunden, die einmal normale Diät, zum anderen natriumarme Diät bekamen, wurde der Einfluß einer Aortenkonstriktion auf die Reninabgabe untersucht. Zwar zeigten alle 10 Hunde einen Anstieg der Plasma-Reninaktivität, dieser war jedoch bei den Hunden mit niederer Natriumdiät signifikant höher. Ein Unterschied lag auch darin, daß der erhöhte Plasma-Reninspiegel bei den natriumarmen Tieren während der ganzen Periode der Aortenklammung anhielt, während von den Tieren mit normaler Diät in 2 von 5 Fällen während dieser Zeit spontan die Plasma-Reninaktivität zur Norm sank, desgleichen der initial erhöhte Blutdruck. Im Gegensatz zur Beziehung zwischen Reninfreisetzung und Natriumaufnahme konnten die Autoren keine Beziehung finden zwischen den hämodynamischen Effekten einer Noradrenalininfusion und der Reninabgabe. 4 von 12 Hunden mit normaler Diät zeig-

ten bei Infusion von Noradrenalin und gleichzeitiger NaCl-Infusion einen Plasma-Reninaktivitätsanstieg. Nur 1 von 4 Hunden mit normaler Diät zeigte einen Plasma-Reninaktivitätsanstieg nach Noradrenalin-Infusion ohne gleichzeitige Gabe von NaCl. 2 von 5 natriumarm ernährten Hunden zeigten bei der kombinierten Gabe von Noradrenalin und NaCl einen Plasma-Reninaktivitätsanstieg, jedoch alle 9 natriumarm ernährten Hunde hatten eine erhöhte Plasma-Reninaktivität bei alleiniger Infusion von Noradrenalin. Die Autoren folgerten, daß dem Natrium wohl eine gewichtige Rolle bei der Reninausschüttung zukommen müsse. Schon bald entstand dann der Konflikt, ob es das distale Natrium-Load oder Natriumkonzentration wäre, die für die Reninabgabe ursächlich wäre, und zum anderen, ob eine Erniedrigung oder eine Erhöhung dieser Parameter. Mikropunktionsdaten, die während einer Reduzierung des Nierenarteriendruckes gewonnen wurden, ergaben eine Erhöhung der fröhdistalen Natriumkonzentration und eine Erniedrigung des Natrium-Loads (69). Umgekehrt erhöhte eine Mannitoldiurese, von der gezeigt wurde, daß sie die durch Druckerniedrigung ausgelöste Reninfreisetzung verhinderte (117), das distale Natrium-Load und erniedrigte die distale Natriumkonzentration. Um beide Faktoren zu erniedrigen, verwendete Vander (119) eine Ureterokklusion während maximaler Mannitoldiurese. Er berief sich auf Versuche, bei denen gezeigt worden war, daß die Natriumkonzentration in der Henle'schen Schleife und fröhdistal während Ureterokklusion gleichbleibt oder leicht absinkt (Stop-flow-Versuche, 79), das Natrium-Load dagegen praktisch aufhört (102). Vander fand eine erniedrigte Reninsekretion während Mannitoldiurese und einen starken Anstieg der Reninaktivität infolge der während dieser Zeit angelegten Ureterokklusion, die nach deren Lösung innerhalb von ca. 20 min zur Norm zurückkehrte. Daraus schloß er, daß es das erniedrigte Natrium-Load sein müsse,

das Renin auslöst. In späteren Untersuchungen (22), deren Ziel es war, die Renin kontrollierenden Mechanismen während niedriger NaCl-Diät zu finden, stellte Vander fest, daß 24 Std. nach Beginn einer kochsalzarmen Diät bei wachen Hunden das arterielle Renin signifikant gegenüber Kontrolltieren anstieg und während der gesamten Versuchsdauer hoch blieb. Nach Absetzen der Diät kehrte es in 48 Std. zur Norm zurück. Die Parameter arterieller Mitteldruck, Blutdruckamplitude, HMV, Plasma-Natrium und Kalium, PAH und Kreatinin-Clearance blieben unter Versuchsbedingungen unverändert. Denervierung der Nieren verlangsamte die Reninantwort auf NaCl-Entzug, verhinderte sie jedoch nicht. Dagegen zeigten sowohl Ganglion- wie auch α - und β -Blockade keinen Effekt auf die Plasma-Reninaktivität unter der NaCl-armen Diät. Die Autoren folgerten, daß dem autonomen Nervensystem bei der Erhöhung der Reninsekretion unter kochsalzarmer Diät keine primäre Rolle zukommt.

Von einer ganz anderen Seite wurden Untersuchungen über Renin freisetzende Mechanismen von Robertson und Mitarbeitern geführt (89). Sie entnahmen steril Biopsien aus menschlichen Nieren und züchteten mit aufwendigen Methoden in vitro kortikale Zellen davon weiter, die alle Kriterien von juxtaglomerulären Zellen erfüllten. Sie konnten darin mit verschiedenen Methoden Granula nachweisen, die im Lauf des Wachstums der Kultur an Zahl und Größe zunahmen und deren Spezifität mit einem Antihumanrenin-AK vom Kaninchen nachgewiesen wurde. Zugabe von Aktinomycin D oder Puromycin zum Medium verminderte die Zahl der Granula, während O_2 -Reduzierung auf 1% diese vermehrte. Ähnliche Granula wurden in der Wand von hyperplastischen Interlobulararterien gefunden, jedoch nicht in normalen Arteriae interlobulares

oder Arteriolen anderer Gefäßgebiete. Zwischen den Granula sahen die Autoren Bündel von Myofilamenten. Zwar fanden die Autoren in allen Kulturen Granula, jedoch gaben nur die Zellen, die aus pathologisch veränderten Nieren stammten, Renin ins Medium ab, und das auch nur während früher Wachstumsphasen und später nicht mehr. Das wies darauf hin, daß nur in den intakten pathologischen Nieren ein Stimulus zur Reninabgabe vorhanden war, der rasch während des Wachstums verlorenging. Eine ähnliche Methode wurde von Hammersen et al. gewählt (55). Sie untersuchten den Einfluß der Natriumkonzentration des Mediums auf die Reninabgabe aus Nierenrindenschnitten und isolierten Glomeruli. Sie fanden eine verstärkte Reninabgabe der Schnitte wie auch der Glomeruli, die keine Macula densa mehr hatten, bei Erhöhung der Natriumkonzentration extrazellulär, und schlossen daraus, daß in vitro wie in vivo die umgebende Natriumkonzentration ein entscheidender Faktor für die Reninabgabe sein müsse. Gerade diese Arbeit wird später im Zusammenhang mit unseren eigenen Versuchen und den dabei verwendeten Methoden nochmals Erwähnung finden müssen.

In neuerer Zeit wurde, begünstigt durch die Entwicklung empfindlicher Radioimmunoassays für Angiotensin II der Frage nachgegangen, wie und wo Angiotensin I bzw. II entstehen. Bailie, Rector und Seldin (2) untersuchten 1971 den Gehalt an Angiotensin II in arteriellem, Nierenvenen- und Pulmonalarterienplasma und in Nierenlymphe unter Bedingungen, die gewöhnlich die Reninsekretion stimulieren. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß der Lunge die Hauptrolle bei der Konvertierung Angiotensin I zu Angiotensin II zukommt und daß Angiotensin II während der Nierenpassage dem Plasma entzogen wird. Jedoch zeigt sich in Nierenlymphe ein hoher Angiotensin II-Wert, wo noch keine Plasmaspiegel nach-

weisbar sind, was stark für eine Bildung von Angiotensin II in der Niere spricht sowie für das Vorhandensein der nötigen Enzyme. Die Werte für Angiotensin II waren in der Lymphe stets erheblich höher als in den anderen untersuchten Flüssigkeiten. Die Möglichkeit der Herkunft des in der Lymphe enthaltenen Angiotensins II aus dem arteriellen Plasma wurde durch Gabe von C¹⁴-markiertem 5-L-isoLeucin Angiotensin II in die Nierenarterie direkt ausgeschlossen, so daß doch eine de novo-Synthese im Niereninterstitium für die hohen Lymphwerte verantwortlich sein muß. Zur Frage des Zusammenhanges zwischen Angiotensin II und Autoregulation der Niere untersuchten Bailie et al. Nierenlymphe während Senkung des Perfusionsdruckes (3). Sie zeigten, daß der Reningehalt in Nierenlymphe zunimmt, wenn der Perfusionsdruck sinkt. Sie fanden jedoch keine Korrelation zum Gefäßwiderstand und folgerten, daß die Autoregulation nicht durch Angiotensin II vermittelt werden könnte.

Alle bisherigen Untersuchungen über den Reninhaushalt ließen den engen anatomischen Kontakt zwischen dem distalen Tubulus eines Nephrons und seinem Glomerulus außer acht. Vielmehr versuchten alle Untersucher, anhand der Reaktionen der Niere im Ganzen mit ihrem Renin-Angiotensin-System unter den verschiedensten pathophysiologischen Bedingungen des Salzwasserhaushaltes und des Kreislaufs zu einer Klärung der physiologischen Funktion zu kommen. Die Arbeitsgruppe um Thureau begann deshalb, mit Hilfe der Mikropunktions-technik am Einzelnephron die Frage zu prüfen, ob die ionale Zusammensetzung der Tubulusflüssigkeit im Macula densa-Bereich eine Wirkung auf die Funktion des dazugehörigen Glomerulus hat (105). Die Ergebnisse zeigen eine Abnahme des Einzelnephronfiltrates bei einer Erhöhung der Natriumkonzentration im Macula

densa-Bereich. Diese Ergebnisse stimmten mit der von Thureau an anderer Stelle (109, 103) entwickelten Theorie eines intrarenalen Regulationsmechanismus für das tubuläre Natrium-Load überein. Thureau und Schnermann mikropunktierten den distalen Tubulus und injizierten von dieser Stelle aus verschiedene Lösungen an das Macula densa-Segment. Dann wurde die Reaktion des zugehörigen proximalen Segments beobachtet und photographiert. Die Versuche wurden an reninreichen und reninarmen Nieren durchgeführt. Bei der Injektion von zweifach isotoner NaCl-Lösung kollabierten in den reninreichen Nieren 19 von 23 untersuchten Nephronen, wobei sich die Reaktion am gleichen Nephron wiederholt auslösen ließ. Injektion von isotoner Kochsalzlösung führte bei 40 von 45 Nephronen zum proximalen Tubuluskollaps bei den reninreichen Nieren, wogegen bei den reninarmen 20 von 25 Nephronen nicht kollabierten. Bei Injektion von halbisotoner NaCl-Lösung trat bei 4 von 7 Fällen ein Kollaps ein. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Injektion von isotonem NaBr gefunden. In den reninreichen Nieren reagierten 7 von 8 Nephronen mit einem proximalen Kollaps, in den reninarmen was das Ergebnis genau umgekehrt, nur 1 von 8 untersuchten Nephronen reagierte. Wurde das Natriumion durch Cholin ersetzt, so war selbst in reninreichen Nieren nur noch in einem von 7 Nephronen eine Reaktion zu erhalten. Die Injektion von elektrolytfreier, isotoner Mannitollösung in das Macula densa-Segment reninreicher Nieren führte zu keinem Kollaps des proximalen Konvoluts in 13 von 14 Fällen. Im Falle einer Reaktion trat der proximale Kollaps sehr schnell ein, nämlich etwa 10 sec nach Injektionsbeginn. Die Wiedereröffnung dagegen erfolgte erst nach 30 bis 60 sec. Aufgrund dieser Befunde postulierte Thureau einen intrarenalen Rückkoppelungsmechanismus zwischen Macu-

la densa-Segment und afferenter Arteriole zur Regulation des tubulären Natrium-Loads, an dem das Renin-Angiotensin II-System beteiligt ist. Bei dieser Hypothese wird impliziert, daß die Natriumkonzentration an der Macula densa variabel sei und zu einem großen Teil von der Größe des Einzelfiltrats abhängt. Um diesen Parameter zu erfassen, perfundierten Courtney, Nagel und Thureau (30) Henle'sche Schleifen orthograd und untersuchten die Natriumkonzentration sowie die Gesamtosmolalität an einer fröhdistalen Punktionsstelle. Dabei stieg die Natriumkonzentration am Beginn des distalen Konvoluts der perfundierten Nephronen mit steigender Perfusionsstromstärke an. Dabei konnten die Autoren keinen eindeutigen Effekt einer Angiotensin II-Beigabe (5×10^{-3} g/ml) zur Perfusionsflüssigkeit feststellen (82). Diese Befunde unterstützen das Konzept, daß eine Änderung der tubulären Stromstärke die Natriumkonzentration an der Macula densa ändern kann. Schnermann, Nagel und Thureau untersuchten später (93) die fröhdistale Natriumkonzentration nach renaler Ischämie und hämorrhagischer Hypotension. Die distale Natriumkonzentration lag vor der Ischämie im Bereich zwischen 12 und 71 meq/l, wobei im Einzelversuch die fröhdistalen Natriumkonzentrationen einzelner Nephronen untereinander ähnlich waren. Nach einer Ischämie von 30 bis 60 min stieg außer in einem Nephron von 37 untersuchten die fröhdistale Natriumkonzentration an und erreichte teilweise Werte, die mit 140 - 160 meq/l im isotonen Bereich lagen. Das GFR war in allen Versuchen nach der Ischämie erniedrigt, bis maximal 90%, und zwar in den Fällen am wenigsten, in denen die distale Natriumkonzentration am wenigsten angestiegen war. Weiterhin stieg in der Mehrzahl der Versuche das Endharnvolumen im Anschluß an die Ischämie an bis maximal auf das 20fache der Kontrolle.

Diese postischämische Polyurie war in den Fällen nicht nachweisbar, in denen das Filtrat am stärksten eingeschränkt war. In allen Versuchen blieb aber das Inlinkonzentrationsverhältnis Urin/Plasma als Ausdruck einer verminderten Resorptionsleistung nach der Ischämie herabgesetzt. Die im Endharn pro Zeiteinheit ausgeschiedene Natriummenge war in den meisten Versuchen postischämisch vergrößert und die prozentuale Ausscheidung des tubulären Natrium-Loads erreichte Werte bis maximal 19%. Die Kaliumausscheidung änderte sich nicht einheitlich. Ferner wurde die fröhdistale Natriumkonzentration am gleichen Nephron vor und nach Ischämie bestimmt, dessen Henle'sche Schleife mit konstanter Stromstärke perfundiert wurde. Dabei stieg die fröhdistale Natriumkonzentration von 44 - 64 meq/l in der Kontrolle auf 98 - 143 meq/l nach der Ischämie an. Auch nach einer hämorrhagischen Hypotension lagen die Mittelwerte der fröhdistalen Natriumkonzentration mit 80, 117 und 153 meq/l über dem Mittelwert aus der Kontrollperiode der Ischämieversuche, die 34 meq/l beträgt. Diese Mittelwerte lagen auch höher als der höchste Einzelwert der Kontrollperiode von 71 meq/l. Diese Versuche zeigten, daß unter Bedingungen, die bekanntermaßen mit erhöhten Reninwerten einhergehen, auf Einzelnephronebene die Voraussetzungen für ein Aktivwerden des Renin-Angiotensin II-Mechanismus, wie sie von Thureau und Mitarbeitern postuliert wurden, vorliegen. Die Folgerungen der Autoren aus den Befunden der vorliegenden Arbeit gingen schließlich dahin, daß es sich bei der Filtratverminderung infolge renaler Vasokonstriktion um eine regulatorische Anpassung an eine verminderte zelluläre Leistung der Tubuli handelt: Die Resorption des filtrierte Natriums erfolgt durch einen aktiven, O_2 verbrauchenden Transportmechanismus der Tubuluszellen (34, 72, 124). Somit war

der Renin-Angiotensin II-Mechanismus als natriumkonservierender Mechanismus anzusehen, der unter entsprechenden Bedingungen den passiven Vorgang der Filtration dem nachgeschalteten aktiven Vorgang der Resorption (hauptsächlich des Natriums als wichtigstem Ion) und dessen Leistung anpaßt. Eine solche Anpassung setzt natürlich die Registrierung einer verminderten Tubulusfunktion voraus. Der juxtaglomeruläre Apparat mit seinen Einzelementen scheint für eine solche Rolle in jeder Hinsicht geeignet: Die Macula densa sitzt in einem distalen Teil des Nephrons, in dem normalerweise ein Konzentrationsgradient durch zelluläre Funktion aufrechterhalten wird und kommt somit als Ort der Messung in Frage. Die Macula densa ist mit dem Glomerulus des eigenen Nephrons anatomisch eng verbunden. In den epitheloiden Zellen des juxtaglomerulären Apparates wird das für die Freisetzung des vasoaktiven Angiotensins II notwendige Renin gebildet. Eine Erhöhung der unter normalen Bedingungen durch aktive zelluläre Leistung hypotonen Werte der Natriumkonzentration im Bereich der Macula densa könnte also dort registriert werden und über eine Aktivierung des Renin-Angiotensin II-Systems zu einer Drosselung des Filtrats des betroffenen Nephrons führen mit der obengenannten Anpassung. Der primäre Steuerungsfaktor für die Reninfreisetzung und Angiotensin II-Bildung scheint also in der Resorptionscharakteristik des Tubulus für Natrium und deren Änderungen durch physiologische wie auch pathophysiologische Einflüsse zu liegen.

Gleichwohl schrieb eine Reihe von Autoren dem Angiotensin einen direkten Einfluß auf diese Resorptionscharakteristik zu. Von Davis (32) stammt die Vorstellung, daß Angiotensin die Aldosteronsekretion fördert und somit sekundär eine natriumretinierende Wirkung

ausübt. Von anderen, vielfach klinisch orientierten Autoren wurde versucht, mit der Clearance-Technik eine direkte tubuläre Wirkung auf die Natriumresorption nachzuweisen (14, 16, 35, 61, 70, 74, 76, 71, 88, 96, 95, 116). In solchen Fällen, in denen das GFR durch die Angiotensingabe nicht verändert wurde, stieg die Natriumausscheidung an. Diese Befunde wurden als Ausdruck einer direkten Hemmung der tubulären Natriumresorption gedeutet. In einer Untersuchung mit Hilfe der Mikropunktionstechnik klärten Thureau und Mitarbeiter diese Frage einer direkten Beeinflussung der Natriumresorption durch Angiotensin. Sie fanden keinen Anhalt dafür, daß die Transportkapazität des Tubulus für Natrium durch Angiotensin verändert wird (63). Die Halbwertszeit, gemessen mit der Split-drop-let-Methode nach Gertz, war bei GFR von 0.66 - 1.26 ml/g Niere/min konstant mit 9.4 ± 0.4 sec und änderte sich nicht, wenn die tubuläre oder peritubuläre Angiotensinkonzentration erhöht wurde. Ein direkter Einfluß des Angiotensins auf die proximale Transportkapazität für Natrium war also nicht nachweisbar. Die Henle'schen Schleifen wurden untersucht, indem die fröhdistalen Natrium- und Inulinkonzentrationen gemessen wurden während orthograder Perfusion mit Kochsalz als Kontrolle und nach Zugabe von 0.5 und 5.0×10^{-6} g/100 ml Angiotensin. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Beziehung Perfusionsrate/Natriumresorption mit und ohne Angiotensin im Perfusat. Diese Befunde zusammen mit der Feststellung, daß sowohl das Urinvolumen wie auch die Natriumausscheidung bei der narkotisierten Ratte während i.v. Infusion von Angiotensin gleichblieben, zeigen, daß Angiotensin II keinen direkten Einfluß auf die tubuläre Transportkapazität für Natrium hat. Ferner wurde von Nagel gezeigt, daß auch an der funktionell ähnlichen Froschhaut von *Rana tem-*

poraria Angiotensin keine Wirkung hat (106). Eine Zugabe von $40 - 800 \times 10^{-9}$ g/ml Angiotensin in beidseitigen Badlösungen änderte weder den Kurzschlußstrom noch das transmembranale Potential. Zu gleichen Resultaten kamen Barbour et al. (7), die auch keine Beeinflussung der ADH-bedingten Steigerung des Natriumtransportes durch Angiotensin sahen. Es ergibt sich somit kein Anhalt, daß Angiotensin II den aktiven Natriumtransport oder die Natriumpermeabilität der Froschhaut verändert.

1970 gelang es Schnermann und Mitarbeitern (94), die in der früheren Arbeit gemeinsam mit Thureau vermutete Abhängigkeit des GFR von der Stromstärke in der Henle'schen Schleife und der damit einhergehenden Änderungen der Natriumkonzentration im Macula densa-Segment zu quantifizieren. In einer aufwendigen Mikropunktionsanordnung perfundierten sie die Henle'sche Schleife eines Nephrons orthograd und maßen gleichzeitig das Einzelfiltrat dieses Nephrons sowie den Druck im proximalen Tubulus. Der tubuläre Fluß in die Schleife wurde durch einen Ölblock unterbrochen. Ferner wurde quantitativ die distale Flüssigkeit gesammelt und deren Volumen sowie Zusammensetzung bestimmt, nachdem auch hier distal von der Punktion ein Ölblock angelegt war. Als Perfusionslösungen wurden verwendet:

1. Ringerlösung bestehend aus 130 mMol/l NaCl, 10 mMol/l NaHCO_3 , 4 mMol/l KCl, 2 mMol/l CaCl_2 , 45 mg% Harnstoff und 0.1% Lissamingrün
2. 300 mMol/l Mannitol mit 0.1% Lissamingrün
3. 70 mMol/l Na_2SO_4 , 2 mMol/l K_2SO_4 , 80 mMol/l Mannitol und 0.1% Lissamingrün.

Bei den Versuchen mit konstantem proximalem Druck von 15 mmHg ergab sich bei einer mittleren Steigerung der Perfusionsrate bei Verwendung von Ringerlösung von

19.3 ± 1.8 nl/min eine mittlere Abnahme des Einzelfiltrats von 10.7 ± 1.3 nl/min. Dabei blieb das proximale TF/P Inulin konstant mit 1.3 (Abb. 1).

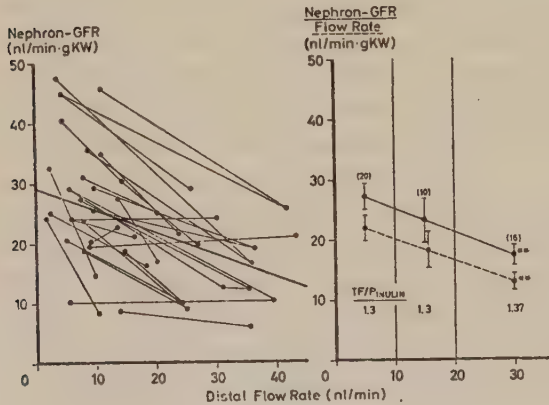


Abb. 1: Beziehung zwischen distaler Stromstärke und Einzelnephronfiltrat während Perfusion mit Ringerlösung und gleichzeitiger Kontrolle des proximalen intratubulären Drucks.

Links: Einzelergebnisse

Rechts: Ergebnisse gruppiert und gemittelt; die Zahlen in Klammern entsprechen der Zahl der Beobachtungen (Signifikant $p < 0.001$).

Aus: Schnermann et al., 1970 (94).

Das Verhältnis zwischen distaler Natriumkonzentration und Perfusionsrate zeigt Abbildung 2. In dieser Abbildung sind Werte von Versuchen mit und ohne Druckkontrolle enthalten. Man sieht, daß die distale Natriumkonzentration ein Minimum von rund 60 meq/l bei einer

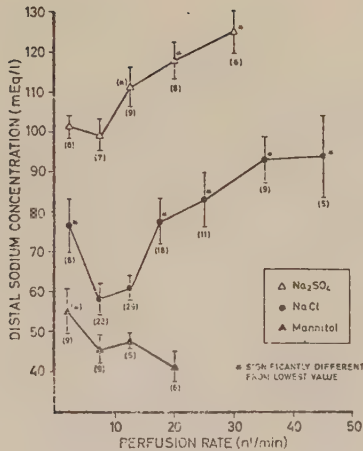


Abb. 2: Beziehung zwischen Perfusionsrate und distaler intratubulärer Natriumkonzentration während Perfusion der Henle'schen Schleife mit NaCl (schwarze Punkte), Natriumsulfat (offene Dreiecke) und Mannitol (schwarze Dreiecke).

Aus: Schnermann et al., 1970 (94).

Perfusionsrate von rund 10 nl/min hat mit steigender Tendenz sowohl bei Zu- wie auch Abnahme der Perfusionsrate. Eine ähnliche biphasische Beziehung ergibt sich, wenn man die distale Natriumkonzentration auf distale Stromstärken anstatt auf Perfusionsraten bezieht. Die Menge des resorbierten Natriums wie auch des Wassers steigt mit steigender Perfusionsrate, wogegen die fraktionelle Natriumresorption von rund 75% auf rund 50% fällt. Auch die fraktionelle Wasserre-

sorption sinkt, bestimmt anhand der Zunahme der Inulin-konzentration.

Wird der Versuch in gleicher Anordnung mit Mannitol als Perfusat durchgeführt, so steht einer mittleren Zunahme der Perfusionsrate von $15.5 \text{ nl/min} \pm 1.8 \text{ S.E.}$ eine Abnahme des Einzelfiltrats von nur $2.0 \pm 1.6 \text{ nl/min}$ gegenüber, die nicht signifikant ist. Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, fällt die distale Natriumkonzentration von im Mittel $55.1 \pm 5.6 \text{ meq/l}$ während niedriger Perfusionsraten auf $41.3 \pm 3.8 \text{ meq/l}$ während hoher Raten. Ferner wurde noch mit isotoner Natriumsulfat-Lösung perfundiert. Dabei war bei einer mittleren Zunahme der Perfusionsrate von $14.9 \pm 1.6 \text{ nl/min}$ eine nicht signifikante Abnahme des Einzelfiltrats von $1.9 \pm 1.4 \text{ nl/min} \times \text{g Niere}$ gemessen worden. Die mittlere Zunahme der distalen Natriumkonzentration von $15.1 \pm 2.7 \text{ meq/l}$ war in dieser Gruppe signifikant. Zusammengefaßt ergibt sich folgendes Bild (Abb. 3): Mit Erhöhung der Perfusionsrate mit Ringerlösung erhöht sich das distale Natrium-Load. Obwohl bei niedrigen Perfusionsraten die distale Natriumkonzentration wieder steigt, nimmt das Natrium-Load ab. Somit scheint dem Natrium-Load die Hauptrolle zuzukommen, denn dieses zeigt über den ganzen Bereich die postulierte umgekehrte Beziehung zum Einzel-GFR. Jedoch ist das Natrium-Load bei Perfusion mit Natrium-Sulfat offensichtlich nicht wirksam, obwohl es mit der Stromstärke ansteigt. Dementsprechend müßte man postulieren, daß nur die Menge des distalen Natriums, die in die Zellen eindringen kann, die Filtrationsrate zu beeinflussen vermag. Es könnte sein, daß die zelluläre Natriumaufnahme sich direkt mit dem Natrium-Load des Macula densa-Segments ändert. Offen blieb immer noch die Frage, ob das Renin-Angiotensin II-System bei die-

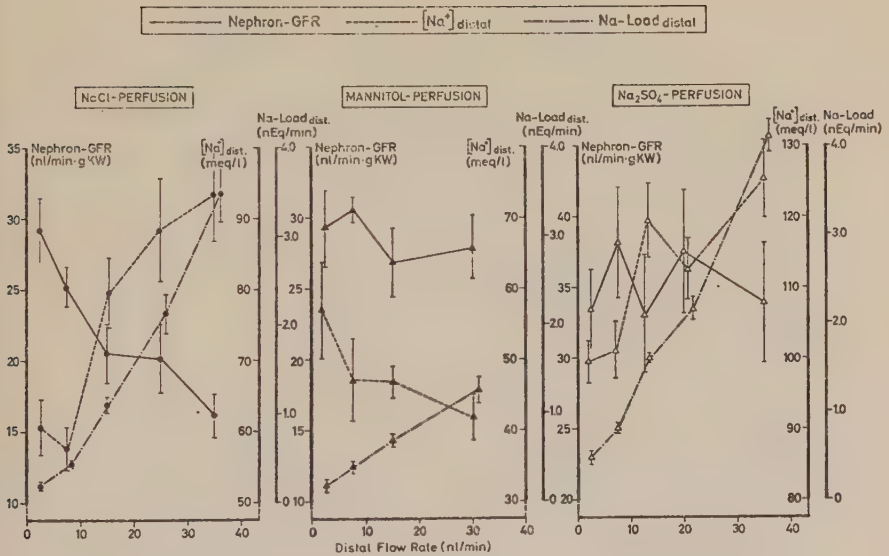


Abb. 3: Beziehung zwischen distaler Stromstärke und Einzelnephronfiltrat (linke Koordinaten) bzw. distaler Natriumkonzentration und distalem Natrium-Load (rechte Koordinaten) während Perfusion der Henle'schen Schleife mit NaCl-Lösung (links), Mannitollösung (Mitte) und Natrium-Sulfatlösung (rechts).

Aus: Schnermann et al., 1970 (94).

sem Regulationsmechanismus eingeschaltet ist oder nicht. Diesem Problem mußten also die nächsten Untersuchungen gelten. Da der postulierte Mechanismus auf ein einzelnes Nephron beschränkt sein sollte, galt es, die Änderung der Reninaktivität des einzelnen JGA durch Änderung der ionalen Zusammensetzung der Tubulusflüssig-

keit im Macula densa-Segment zu bestimmen. Dazu war es zunächst notwendig, einen Mikronachweis für Reninaktivität in einem einzelnen JGA zu entwickeln. Zum anderen mußten Reninsubstrat, Renin und Converting Enzym-Aktivität vorhanden sein, wenn Angiotensin intrarenal gebildet werden sollte (107). Reninsubstrat wurde von Lever und Peart in der Nierenlymphe gefunden als Zeichen dafür, daß es auch im Niereninterstitium verteilt ist. Dem Nachweis von Renin im JGA ist in der vorliegenden Arbeit ein ganzes Kapitel gewidmet. So blieb zunächst noch zu zeigen, daß auch Converting Enzym-Aktivität im JGA vorhanden ist. Zu diesem Zweck wurden einzelne, mikrodissizierte JGAs von Rattennieren mit einem hochgereinigten Reninsubstrat inkubiert. Dieses Substrat ist wesentliche Voraussetzung für enzymkinetische Untersuchungen an einzelnen JGAs. Abbildung 4 zeigt schematisch die Schritte der Präparation. Das Plasma wurde gewonnen von bilateral nephrektomierten (24 Std.), salzreich ernährten Ratten (14 d) und fraktioniert durch Aussalzen mit NaCl von 19- 21 g% bei pH 3.2 oder mit Ammoniumsulfat von 22 - 26 g% bei pH 7.5. Es wurde weiter gereinigt durch Sephadex Gel-Filtration G 75 gefolgt von präparativer Disc Elektrophorese. Jeder Schritt wurde bei 0 - 5° C durchgeführt und war von Dialyse gegen destilliertes Wasser gefolgt. Das Substrat hat einen spezifischen Gehalt von 1000 - 2000 ng/mg Protein. Es ist frei von Renin, Converting Enzym-Aktivität und Angiotensinasen. Dieser hohe Reinheitsgrad erlaubt die quantitative Bestimmung der Reninaktivität in einem einzelnen JGA in einem Inkubationsvolumen von 0.1 ml innerhalb von weniger als einer Stunde.

Alle Inkubate wurden auf Angiotensin I und Angiotensin II mittels Blutdruckversuch an der Ratte und auf

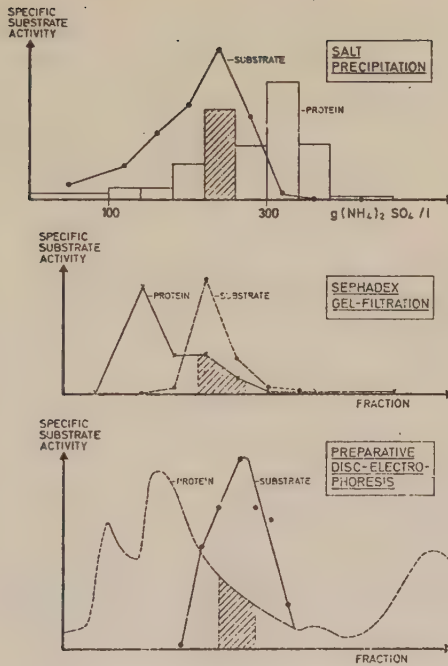


Abb. 4: Reinigung des Reninsubstrats.

Oben: Die Säulen entsprechen dem Prozentsatz des gesamten Proteins, das bei pH 7.5 ausgefällt wird. Die Ordinate gibt den spezifischen Substratgehalt der ausgefällten Proteinfraction an (ng/mg Protein, ausgedrückt als Hypertensin-ČIBA);

Mitte: Das Ammoniumsulfat-Präzipitat zwischen 22 und 26 g% (gestricheltes Feld) wurde durch Sephadex G 75-Gelfiltration weiter gereinigt. Die Kreuze entsprechen der Proteinkonzentration des Eluats. Die Punkte zeigen die spezifische Substratkonzentration der abgetrennten Proteine. Die Proteine des gestrichelten Feldes wurden der präparativen Disc-Elektrophorese unterworfen.

Unten: Spezifische Substratkonzentration der abgetrennten Proteine.

Aus: Thureau et al., 1969 (107).

Angiotensin II mittels eines Aortenstreifens vom Kaninchen ausgeführt. Die Enzyme wurden aus dem Gewebe des JGA mittels Ultraschall-Homogenisierung in 0.1 ml Inkubat ausgelöst. Die Homogenisationszeit war kritisch (s. Abb. 5). Ein Maximum an Reninaktivität war nach einer Zeit zwischen 5 und 15 sec enthalten.

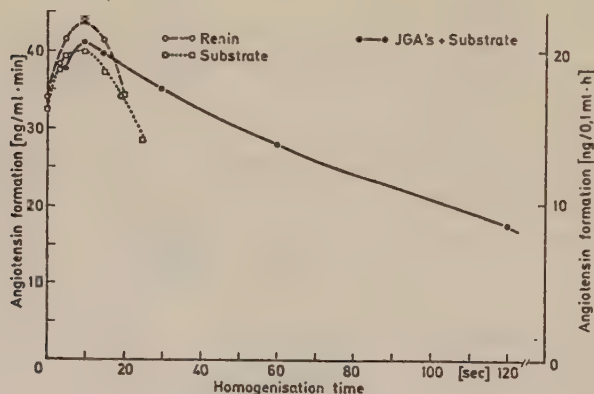


Abb. 5: Der Effekt der Homogenisierungszeit auf 1. JGAs + Substrat, 2. Renin und 3. Substrat allein.

Aus: Thureau et al., 1969 (107).

Abbildung 6 zeigt die Blutdruckantwort einer Ratte auf ein Inkubat, das Rattensubstrat im Überschuß und einen Glomerulus ohne JGA enthält. Die gleiche Abbildung zeigt daneben die Antwort auf ein Inkubat aus einem einzelnen JGA und Substrat. Abbildung 7 zeigt typische Verläufe der Zunahme von Angiotensin im Inkubat als Funktion der Zeit. Wurde Substrat nur mit Renin inkubiert, so konnte die Entstehung von aus-

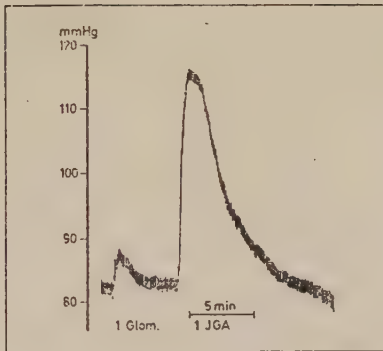


Abb. 6: Blutdruckeffekt eines inkubierten einzelnen JGA bzw. Glomerulus. JGA und Glomerulus werden getrennt mit einem Überschuß von gereinigtem Ratten-Reninsubstrat inkubiert. Die Antworten wurden nach Injektion von 0.05 ml Inkubat erhalten.

Aus: Thurau et al., 1969 (107).

schließlich Angiotensin I gezeigt werden. Das folgt aus der Tatsache, daß das Inkubat zwar eine Blutdruckantwort bei der Ratte auslöste, jedoch keine Kontraktion des Kaninchen-Aortenstreifens. Abbildung 8 zeigt zusammengefaßt den Weg der Identifizierung von Angiotensin II. Wurde jedoch ein JGA zusammen mit Substrat inkubiert, so zeigte sich ein vergleichbarer Effekt in beiden Versuchsanordnungen. Damit war eindeutig gezeigt, daß der JGA die Fähigkeit zur Konvertierung des Angiotensin I und damit Convering Enzym-Aktivität besitzt.

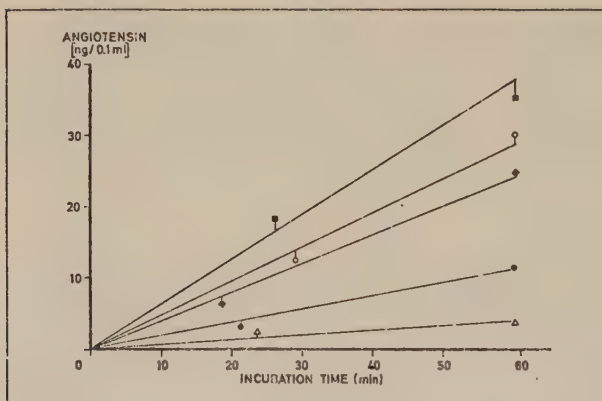


Abb. 7: Zeitabhängigkeit der Angiotensinbildung durch einen einzelnen JGA, inkubiert mit Reninsubstrat im Überschuß bei pH 6.5.
Aus: Thureau et al., 1969 (107).

	Inkubiert mit:	Aortenstreifen	Blutdruck Ratte
Gereinigtes Ratten-Substrat	allein	-	-
	Renin	-	+
	JGA	+	+
	Renin + JGA	+	+
JGA	allein	-	-
	Angiotensin II-Amid	+	+

Abb. 8: Identifizierung von Angiotensin II. Angiotensin II wurde nur gefunden, wenn zum Reninsubstrat ein JGA zugegeben wurde.
Aus: Thureau et al., 1969 (107).

Das schien zwar zunächst Befunden von Ng und Vane (83) zu widersprechen, die nach Gabe von Angiotensin I in die Nierenarterie keine Konvertierung nach Nierenpassage fanden. Wenn aber die Converting Enzym-Aktivität im JGA lokalisiert und dort evtl. strukturell gebunden wäre, so dürfte man auch keine Konvertierung in meßbaren Mengen erwarten. Angiotensin I würde dann quasi an der Stelle der maximalen Converting Enzym-Aktivität vorbeilaufen.

Somit war der Nachweis erbracht, daß alle Substanzen, die für eine intrarenale Bildung von Angiotensin II nötig sind, im JGA vorliegen. Die Voraussetzungen für ein Wirksamwerden des postulierten Kontrollmechanismus auf der Ebene eines Nephrons unter Einschaltung des Renin-Angiotensin-Systems sind also gegeben.

In weiteren Untersuchungen wurden die optimalen Reaktionsbedingungen für die Inkubation mikrodissasierter Ratten-JGAs im homologen System Ratten-Substrat und -Renin definiert (115). Die Angiotensinbildungsrate wurde bei verschiedenen pH gemessen (Abb. 9). Dabei

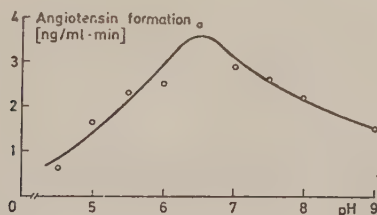


Abb. 9: Der Effekt des pH auf die Angiotensinbildung. Substratkonzentration 1000 ng/ml. Homologes Renin in 150 mM/l Phosphatpuffer. Temperatur 37° C.

Aus: Dahlheim et al., 1970 (33).

wurde die maximale Rate bei pH 6.5 gefunden; die Versuche wurden bei 37° C und in 150 mMol/l Phosphatpuffer durchgeführt. Dieses pH-Optimum ist in Übereinstimmung mit anderen Autoren (17) bei 6.5 und wurde in neuerer Zeit von Menard und Catt (80) bestätigt, die die Angiotensin I-Bildung radioimmunologisch verfolgten.

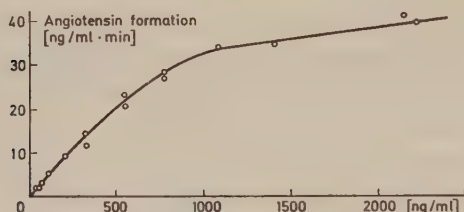


Abb. 10: Der Effekt der Substratkonzentration auf die Angiotensinbildung bei 37° C und pH 6.5 in 150 mMol/l Phosphatpuffer.

Aus: Dahlheim et al., 1970 (33).

Abbildung 10 zeigt die Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Bei Werten über 1000 ng/ml erreicht die Angiotensinbildung ein Plateau. Da die Reninaktivität eines JGAs etwa 1/10 der bei den Messungen verwendeten entspricht, wurde für alle folgenden Versuche eine Substratkonzentration von über 1000 ng/ml für ausreichen gehalten, einen Überschuß zu garantieren. Die Abbildung 11 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Reaktion. Das Maximum lag dabei bei 50° C mit dem typischen steilen Abfall zu beiden Seiten dieses Wertes. Zwischen 10 und 20° C ist der Temperatureinfluß unerheblich. Wurden alle bisher untersuchten Parameter kon-

stant gehalten, so konnte eine lineare Abhängigkeit der Reaktion von der Reninkonzentration bis zu 50 ng/ml x min gezeigt werden. Höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht (Abb. 12).

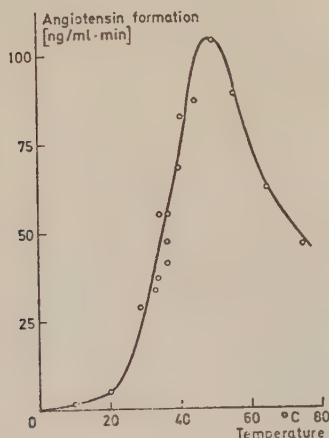


Abb. 11: Der Effekt der Temperatur auf die Angiotensinbildung bei pH 6.5. Substratkonzentration über 1000 ng/ml, 150 mMol/l Phosphatpuffer. Aus: Dahlheim et al., 1970 (33).

Die Aktivität der Angiotensinase war unter diesen Bedingungen der Reninbestimmung sehr niedrig und konnte vernachlässigt werden. Das zeigt die Beobachtung, daß von Hypertensin-CIBA wie auch von natürlichem Ratten-Angiotensin II nur 7% in 1 Std. zerstört wurden bei Verwendung oberflächlicher JGAs. Das liegt im Bereich der Genauigkeit der Methode. Bei Verwendung juxtamedullärer JGAs muß die Angiotensin IIase-Aktivität jedoch beachtet werden, da sie höher liegt (s.u.).

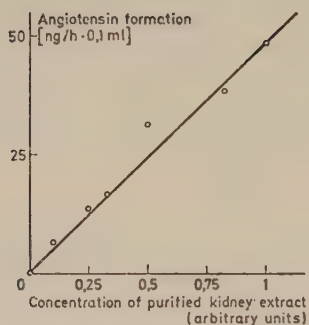


Abb. 12: Der Effekt der Reninkonzentration auf die Angiotensinbildung. pH 6.5, Temperatur 37° C, Reninsubstratkonzentration 1150 ng/ml, 150 mMol/l Phosphatpuffer.

Aus: Dahlheim et al., 1970 (33).

Das Hauptproblem der quantitativen Reninbestimmung in einzelnen JGAs war der geringe absolute Reningehalt dieser Struktur. Die wesentlichste Voraussetzung zu dessen Lösung war die Herstellung eines hochgereinigten Substrates, wie sie hier beschrieben wurde. Die hohe spezifische Substratkonzentration und das kleine Inkubationsvolumen von 0.1 ml machten es möglich, die Reninaktivität einzelner JGAs innerhalb von 15 - 60 min zu bestimmen. Das scheint die wesentlichste Verbesserung bei der Mikroreninbestimmung gegenüber früheren Methoden zu sein. Brown et al. (20) hatten bis zu 96 Std. inkubiert. In allen weiteren Messungen wurde bei 37° C inkubiert. Da die Temperaturabhängigkeit in diesem Bereich einen steilen Verlauf zeigt, war der genauen Einhaltung der Inkubationstemperatur größte

Aufmerksamkeit zu schenken.

Der optimale Bereich zur quantitativen Angiotensinbestimmung im Rattenversuch liegt bei 10 - 30 ng/ml bei einem Injektionsvolumen von 0.05 ml. Das entspricht einer absoluten Angiotensinmenge von 0.5 - 1.5 ng, die injiziert wird. Um Verdünnungen oder Substratverluste zu vermeiden, sollte die Reaktion durch Kochen gestoppt werden, wenn 30 - 50 ng/ml Angiotensin II gebildet sind. In diesem Fall ist die Substratkonzentration um rund 5% vermindert.

In weiteren Untersuchungen (52) wurde die Methode der Reninbestimmung wie oben angegeben verwendet, um in größeren Serien die Enzymaktivitäten von einzelnen JGAs zu bestimmen sowohl im Hinblick auf die Wahl der Dissektionsmethode als auch das Verhalten der Reninaktivität des einzelnen JGAs unter verschiedenen physiologischen Bedingungen. Wie schon früher, konnte erneut gezeigt werden, daß in den JGAs Converting Enzym-Aktivität vorhanden ist. Da jedoch bis dato die optimalen Reaktionsbedingungen unbekannt sind, konnte keine Quantifizierung erfolgen. Bei der Bestimmung der Angiotensin IIase-Aktivität, die als $t_{1/2}$ von Hypertensin ausgedrückt wurde, war in einer Niere keine Angiotensin IIase nachweisbar, weder in oberflächlichen noch in tiefen JGAs. In einer anderen Niere hatten die tiefen JGAs eine längere Halbwertszeit. In allen übrigen Fällen war die Angiotensin IIase-Aktivität in den tiefen JGAs größer als in den oberflächlichen. Aus 5 Nieren wurden kleine Stückchen äußerer Cortex und Markgewebe, die in ihrer Größe etwa einem Glomerulus entsprachen, getestet. Die höchste Aktivität wurde in glomerulärem äußerem Cortex gefunden. Die Werte aus Markgewebe zeigten eine große Streuung von 0.93 Std. bis ∞ . Die wenigen Proben von Vasa recta und Arteriae interlobulares

zeigten keine besonders kurzen Halbwertszeiten.

Alle bisherigen Präparationen waren nach der zuerst verwendeten Methode durchgeführt worden, bei der die frische Niere zur Dissektion verwendet wurde. Da diese Methode später nicht mehr angewandt wurde, soll hier nur eine knappe Beschreibung folgen. Sie besteht in der Injektion 2%iger Evans blue-Lösung in isotoner NaCl-Lösung und Abklemmen der Niere, sobald die Oberfläche eine blaue Farbe annimmt. Dann wird die Niere in 1 - 2 mm dicke Scheiben geschnitten, die in 30% Glycerin in 0.9% NaCl bei 0 - 5° C feucht gehalten werden. Dann wird unter dem Stereomikroskop die Dissektion durchgeführt, die nie 90 min überschreitet, gerechnet von der Entfernung der Niere. Da die so erhaltenen JGAs noch Blut enthalten, das für die entdeckte Aktivität verantwortlich sein könnte, wurde die Bestimmung an 5 Nieren wiederholt, die nach der neueren Methode mit Injektion von Microfil, Einfrieren in Trockeneis in Azeton und Gefriertrocknung behandelt wurden (genaue Beschreibung folgt), da die Niere in diesem Falle kein Blut mehr enthält. Das Ergebnis war jedoch identisch. Zusammengefaßt wurde festgestellt, daß in oberflächlichen JGAs nach einer Stunde im Mittel $6.5 \pm 7.2\%$ Angiotensin II zerstört wurde gegenüber $11.5 \pm 12.5\%$ in tiefen JGAs. Die gleiche Bestimmung nach Zugabe von EDTA zeigte eine Abnahme der Angiotensin II-Zerstörung von rund 50%. Die Werte waren: Für oberflächliche JGAs $3.7 \pm 6.2\%$ und für tiefe $6.5 \pm 7.1\%$.

Besonders im Hinblick auf den Einfluß einzelner Schritte bzw. Agenzien, die bei der neueren Dissektionsmethode Verwendung finden, wurde bei der Reninbestimmung folgendermaßen vorgegangen: Die Reninaktivität wurde vor und nach Einfrieren der Niere in Trockeneis und

Azeton bestimmt, indem eine Niere in zwei Hälften geteilt wurde, von der die eine gefroren, die andere frisch gemessen wurde. Ferner wurde von beiden Nieren, die eine nach Einfrieren, die andere frisch gemessen. In beiden Fällen zeigte sich kein Unterschied im Reningehalt. Microfil, der vor und nach Polymerisation zugegeben wurde, hatte keinen Einfluß auf die Angiotensin II-Bildung. Da bei früheren Untersuchungen (107, 33) unter Verwendung der älteren Dissektionsmethode gefunden worden war, daß nach Teilung eines Glomerulus in Gefäßpol und Kapillarschlingen zwar der überwiegende Teil der Reninaktivität im Gefäßpol enthalten war, jedoch auch in den Kapillarschlingen nachgewiesen werden konnte, wurde der Versuch jetzt unter Verwendung der neueren Methode wiederholt. Dabei konnte im Glomerulus selbst kein Renin mehr nachgewiesen werden. Da die Injektion des Microfil das Blut aus der Niere vollständig entfernt, könnte die früher festgestellte Aktivität aus im Glomerulus enthaltenen Plasma stammen. Zum anderen könnte Renin auch passiv während der Dissektion aus den epitheloiden Zellen in das Glomerulus diffundiert sein. Da dieser Vorgang durch das Einfrieren und Trocknen unterbunden wird, käme auch diese Möglichkeit in Frage, das Vorkommen von Renin in den Glomerulusschlingen bei der früheren Bestimmung zu erklären.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß der aufgenommenen NaCl-Menge auf die Reninaktivität oberflächlicher und tiefer JGAs untersucht. In salzarm ernährten Ratten zeigte sich ein weites Spektrum von Reninwerten, während die Werte bei salzreichen Ratten viel enger liegen (Abb. 13). In beiden Gruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen oberflächlichen und tiefen JGAs ge-

zeigt werden. Ein hochsignifikanter Unterschied war jedoch zwischen den salzreich und salzarm ernährten Ratten. Die mittlere Reninaktivität schwankte in beiden Gruppen stark von Niere zu Niere (Abb. 14).

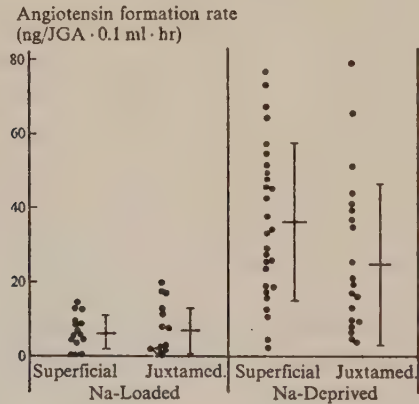


Abb. 13: Reninaktivität einzelner oberflächlicher und juxtamedullärer JGAs natriumarm und natriumreich ernährter Ratten. Die horizontalen Striche entsprechen dem Mittelwert, die vertikalen $\pm$ SD.

Aus: Granger et al., 1972 (52).

Dann wurden noch JGAs von Ratten bestimmt, die mit Altromin-Standard-Diät ernährt wurden. Auch hier war kein Unterschied zwischen oberflächlichen und tiefen JGAs (Abb. 15). Das Spektrum der Werte war sehr weit gestreut, die Mittelwerte lagen für oberflächliche JGAs bei 14.0 ± 10.8 ng/0.1 ml x h, für tiefe bei

Rat No.	Sodium loaded			Sodium deprived				
	R-1	R-2	R-3	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5
Superficial JGA's	8.2	0.0	3.3	27.0	76.1	18.2	17.3	25.0
	5.3	6.7	12.5	27.6	42.1	61.1	56.6	37.1
	8.3	13.0	4.0	16.8	63.9	2.1	44.8	3.8
	14.3	5.7	4.3	32.4	66.7	45.6	47.7	25.3
	0.0	9.0	0.0	15.6	48.8	33.0	12.4	10.6
						23.7		
						54.4		
						72.3		
Mean	7.2	6.9	4.8	23.9	59.5	38.8	35.6	20.4
Mean of all superfic. JGA's		6.3				36.0		
±SD		±4.6				±21.0		
Juxtamedullary JGA's	7.4	12.5	11.3	12.6	43.2	78.4	19.1	0.0
	19.7	1.1	1.6	40.8	16.9	9.1	3.9	25.5
	0.0	2.3	0.0	4.6	0.0		65.1	8.0
	17.2	2.1	1.8	51.0	34.6		39.2	36.9
	16.7	1.3	7.3	20.4	9.3		6.4	16.1
Mean	12.2	3.9	4.4	25.9	20.8	43.7	26.7	17.3
Mean of all juxtamed. JGA's		6.8				24.6		
±SD		±6.9				±21.5		

^a ng of angiotensin (expressed as Hypertensin Ciba) formed per incubation mixture (0.1 ml) containing one JGA after one hour of incubation (ng/JGA · 0.1 ml · hr).

^b Obtained according to Method A of microdissection.

^c See Methods for diets.

Abb. 14: Reninaktivität* einzelner oberflächlicher und tiefer JGAS natriumarm und natriumreich ernährter Ratten.

*ng Antiotensin (als Hypertensin-CIBA) pro Inkubat (0.1 ml) innerhalb einer Stunde (ng/0.1 ml x h x JGA).

Aus: Granger et al., 1972 (52).

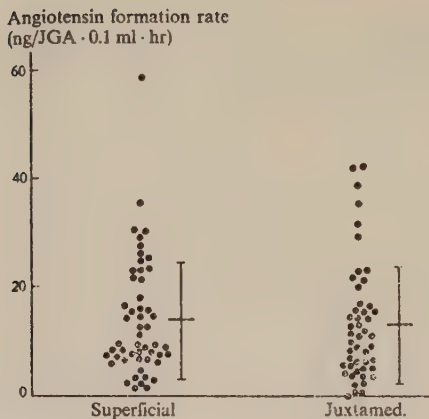


Abb. 15: Reninaktivität einzelner oberflächlicher und juxtamedullärer JGAs der Ratte unter Altromin-Standard-Diät.

Aus: Granger et al., 1972 (52).

13.4 ng/0.1 ml x h $\pm$ 10.8 SD. Extremwerte waren 0 und 58.8. Wie Abbildung 16 zeigt, waren auch hier die Schwankungen von einer Niere zur anderen groß.

Die vorliegende Arbeit hatte gezeigt, daß die neuere Dissektionsmethode vorteilhafter war, besonders aus folgenden Gründen:

1. Microfil entfernt das Blut aus der afferenten Arteriole und dem Glomerulus.
2. Die enzymatischen Prozesse können durch das Einfrieren zu jeder Zeit gestoppt werden.
3. Die Niere kann gefriergetrocknet bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert werden.

	Rat No.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Superficial JGA's	30.0	6.8	30.1	6.8	58.8	8.3	23.0	7.2
	25.7	8.4	7.9	8.4	21.1	21.8	1.6	8.8
	28.8	7.6	15.4	7.6	7.0	3.2	25.4	3.3
	11.2	2.0	23.0	2.0	35.6	9.2	9.6	6.3
	12.6	9.1	25.0	6.6	23.1	15.6	3.8	16.3
	14.6					27.6		
	8.3					15.1		
						2.4		
						15.4		
						7.6		
						12.5		
						3.4		
						17.9		
						5.7		
						14.2		
Mean	18.7	6.8	20.3	6.3	29.1	12.0	12.7	8.4
Mean of all superfic. JGA's	14.0							
±SD	±10.8							
Juxtamedullary JGA's	20.0	6.6	38.9	9.1	29.3	8.7	0.0	15.6
	4.8	0.9	35.4	0.9	15.4	21.9	3.4	5.4
	1.7	23.3	2.7	23.3	16.8	11.4	6.0	11.0
		11.1	31.5	11.1	42.3	6.4	8.4	6.6
		14.4	11.6	14.4	42.3	20.6	2.8	4.6
						5.5		
						6.9		
						3.8		
						9.3		
						16.3		
						14.4		
						13.3		
						12.9		
						5.3		
						15.5		
Mean	8.8	11.3	24.0	11.8	29.2	11.5	4.1	8.6
Mean of all juxtamed. JGA's	13.4							
±SD	±10.8							

^a ng of angiotensin (expressed as Hypertensin-Ciba) formed per incubation mixture (0.1 ml) containing one JGA after one hour of incubation (ng/JGA · 0.1 ml · hr).

^b Obtained according to Method B.

^c Maintained on standard Altromin diet with tap water *ad libitum*.

Abb. 16: Reninaktivität einzelner oberflächlicher und juxta-medullärer JGAs der Ratte.

Aus: Granger et al., 1972 (52).

4. Die Zeit für die Dissektion, ein wesentlicher Faktor bei frischen Nieren, muß nicht mehr beachtet werden.

5. Die Dissektion ist erheblich einfacher.

Es war also jetzt möglich, am einzelnen JGA den Renin-gehalt zu bestimmen, die wesentlichste Voraussetzung für weitere funktionelle Untersuchungen war gegeben. Damit war diese Arbeit der direkte Vorläufer zu der nun folgenden Funktionsanalyse des JGA des Einzelne-phrons, mit Hilfe der Verbindung der Mikropunktion mit der Mikroenzymmessung.

Material und Methoden

Die Versuche wurden an männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 150 - 300 g durchgeführt. Die Ratten wurden mit 100 mg/kg Körpergewicht Inactin intraperitoneal narkotisiert. Die Temperatur wurde mit einer Rektalsonde fortlaufend gemessen. Nach Lagerung auf einem heizbaren Tischchen wurde eine Tracheotomie durchgeführt. Dann wurde ein dünner Polyäthylenkatheter in die linke A. carotis eingeführt, über den zunächst während der gesamten Versuchsdauer der Blutdruck gemessen wurde (strain gauge etc.). Bei Versuchsende wurde durch diesen Katheter dann der Microfil (Canton Biomedical Products, Boulder, Colorado/USA, 80 302) injiziert. Die linke Niere wurde durch einen schrägen Flankenschnitt freigelegt und für die Mikropunktion in einer Aluminiumschale gelagert. Die Oberfläche wurde sorgfältig gereinigt und bis Versuchsende mit Paraffinöl von Körpertemperatur überschichtet. Ein proximaler, oberflächlicher Tubulus wurde mit einer geschliffenen Glaskapillare mit einem äußeren Durchmesser von 8 - 10 μ , die isotone Kochsalzlösung mit 5.0 g% Indigocarmin enthielt, punktiert. Ein kleiner Bolus wurde injiziert und der Verlauf des proximalen Segments beobachtet sowie das distale Erscheinen nach Passage der Henle'schen Schleife. War der distale Tubulus oberflächlich und für eine Punktion nach Lage und Größe geeignet, so wurde er mit einer zweiten Kapillare, die die Testlösung ohne Farbzusatz enthielt, punktiert. Dann wurden die Macula densa und die Schleife retrograd perfundiert. Um eine übermäßige Blähung des proximalen Tubulus zu vermeiden, wurden möglichst spätproximal mehrere Löcher angelegt, die eine Perfusion mit sehr geringem Druck ermöglichten. Zur Kontrolle der mit farbfreier Lösung durchgeführten Perfusion gab es zwei Möglichkeiten: Einmal

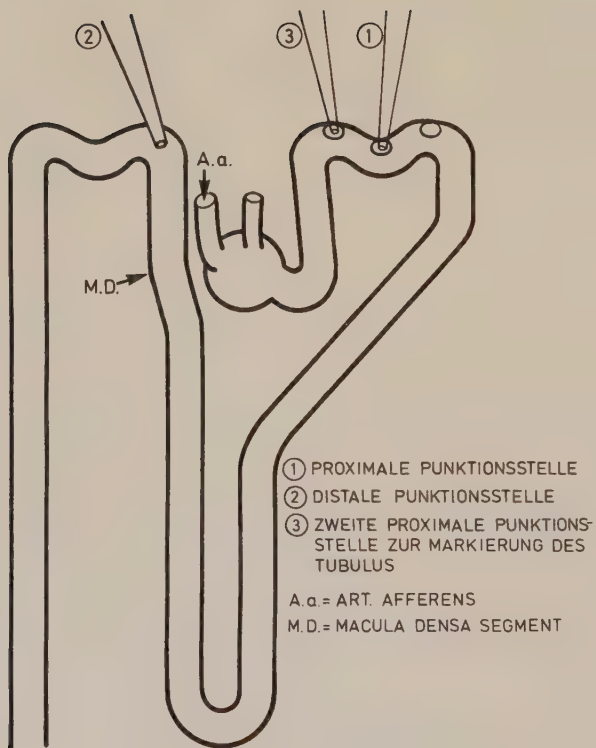


Abb. 17: Schema der Mikropunktion

konnte mit der ersten Punktionskapillare die proximale Austrittsöffnung des Perfusats mit Farblösung überdeckt werden. Bei Wiedereinsetzen der Perfusion von distal konnte man dann die Zerteilung dieser Farbwolke beobachten durch periodisch mit der distalen Druckerhöhung austretendes Perfusat. Zweitens konnte mit der ersten Pipette ein Tropfen Paraffinöl von der Oberfläche abgenommen und in den spätproximalen Tubulus gegeben werden. Beim distalen Erscheinen war es leicht möglich, diesen Tropfen durch leichte Druckerhöhung zum Zurücklaufen zu bringen und durch das proximale Loch wieder austreten zu lassen. Mit einer dieser Methoden wurde die distale Perfusion während der Dauer von rund 20 min mehrfach überprüft. Die retrograde Perfusion war gewählt worden, weil der distale Tubulus der am nächsten an der Macula densa liegende, der Mikropunktion zugängliche Punkt ist. Änderungen der Zusammensetzung des Perfusats durch tubuläre Funktion sollten so auf ein Minimum reduziert werden.

Am Ende der Perfusionsperiode mußte dieser perfundierte JGA markiert werden, um ihn bei der späteren Mikrodissektion identifizieren zu können. Dazu wurde mit einer etwas größeren Kapillare von rund 12 μ Außendurchmesser der proximale Tubulus an einer möglichst frühen Stelle punktiert und oranger Microfil (MV-122 orange 0.8 ml, MV-diluent 0.2 ml und MV-curing agent 0.03 ml zusammengemischt) injiziert. Dabei war besonders die Füllung der Bowman'schen Kapsel wichtig, um eine sichere Erkennung zu gewährleisten. Das proximale Konvolut dagegen sollte möglichst freibleiben, um bei der Dissektion eine bessere Übersicht zu haben. Sobald die tubuläre Füllung gelungen war, wurde von einer Hilfsperson durch den Carotiskatheter gelber Microfil (0.4 ml MV-117 gelb, 0.6 ml MV-diluent und 0.03 ml MV-curing

agent zusammengemischt), insgesamt etwa 1 ml, eingespritzt. Dessen Erscheinen in den Glomeruli wurde unter dem Punktionsmikroskop beobachtet und das weitere Fortschreiten im Nierengefäßsystem durch Schließen einer schon während der Operation um den Hilus gelegten Schlinge verhindert. Dann wurde die Niere sofort entfernt und in dem bereitstehenden Trockeneis/Azeton-Gemisch gefroren. Das früher übliche Übergießen der Niere in situ wurde aufgegeben, da damit ein sofortiges gleichmäßiges Gefrieren nicht gesichert war, andererseits aber die Entfernung der Niere stark erschwert wurde. Die Niere wurde nach etwa 3 min aus der Gefrierflüssigkeit entfernt und bis zur Gefrier Trocknung offen in der Tiefkühltruhe gelagert. Um Beschädigungen der Niere mit starker Erschwerung der Mikrodissektion zu vermeiden, war es wichtig, die Nieren lange genug in der Kühltruhe abtrocknen zu lassen. Sodann wurden alle an einem Tag erhaltenen Nieren auf einmal in die Trocknung gelegt, da dieser Vorgang in den ersten Stunden keinesfalls unterbrochen werden darf. Die Trocknung erfolgte bei $- 5^{\circ}$ C über 24 - 36 Std. Die getrockneten Nieren wurden bis zum Gebrauch in der Tiefkühltruhe bei $- 32^{\circ}$ C geschlossen gelagert.

Mikrodissektion:

Unter Kontrolle mit dem Stereomikroskop wurde die Niere dekapsuliert. Nach dem Auffinden der Punktionsstelle an der Oberfläche wurde dieser Bezirk als Scheibe herausgeschnitten. Dann wurde das markierte Nephron mit einem umgebenden Gewebsblock herausgenommen und mit einem Tröpfchen Wachs auf einer schwarzen Glasplatte befestigt. Unter stärkerer Vergrößerung wurde der Gewebsblock noch trocken auf ein Minimum verkleinert, wie es sicher ohne Beschädigung noch möglich war. Jetzt wurde

ein Tropfen 90%iges Glycerin zugegeben, das die Genauigkeit der Dissektion durch erheblich bessere Übersicht wesentlich erhöhte gegenüber dem zunächst verwendeten Paraffinöl. Ein Einfluß des Glycerins konnte experimentell dadurch ausgeschlossen werden, daß aus einer Kaninchenniere, wo dies leicht möglich ist, nach der üblichen Vorbehandlung je zwei JGAs trocken gewonnen wurden bzw. nach Zugabe von Glycerin. Die Reninwerte waren für die Trockendissektion 68.2 bzw. 58.9 ng/0.1 ml x h und 83.7 bzw. 73.7 ng/0.1 ml x h für die Dissektion mit Hilfe von Glycerin. Die etwas höheren Werte mögen durch eine exaktere Dissektion bedingt sein, liegen aber innerhalb der üblichen Streubreite.

Als interessanten Nebebefund konnten wir in der Kaninchenniere den unterschiedlichen Reningehalt oberflächlicher und tiefer Glomeruli, wie er schon von Brown et al. (20) beschrieben worden war, bestätigen. Dabei handelt es sich also offensichtlich eher um einen Speziesunterschied zwischen Ratte und Kaninchen als um Unterschiede im Gehalt von Angiotensinase, wie vermutet wurde (33). Die Werte für oberflächliche Glomeruli waren (in ng/0.1 ml x h):

122.0	132.0	133.0	125.5	114.9	100.1
-------	-------	-------	-------	-------	-------

In den tiefen Glomeruli wurde gefunden (in ng/0.1 ml x 5 h):

10.3	4.65	6.25	7.3	13.0	5.5.
------	------	------	-----	------	------

Mit einer Vergrößerung zwischen 100 und 160fach wurde aus dem kleinen Gewebsblock der perfundierte JGA präpariert. Die Kriterien für eine Entnahme waren: Einwandfreie Füllung der Bowman'schen Kapsel des Glomerulus, einwandfreie Erkennbarkeit des Gefäßpols und des Verlaufs der afferenten Arteriole. Besonders bei den Perfusionen mit NaCl 140 meq/l gelang es sehr häufig nicht, gerade die Kapillarschlingen des betroffenen Glomerulus zu füllen. Der markierte Glomerulus wurde mit einem

Stückchen Gewebe um die afferente Arteriole entnommen, die in einer Länge, die etwa der Größe eines Glomerulus entspricht, erhalten wurde. Unter dem Mikroskop wurde dieser JGA dann auf ein winziges Stückchen Plastikfolie gelegt und mit diesem zusammen mit einer feinen Pinzette auf den Grund eines Eppendorf Reaktionsgefäßes 3810 gelegt. Diese Gefäße wurden wieder bis zur Messung, die spätestens 24 Std. später erfolgte, in der Gefriertruhe bei $- 32^{\circ} \text{C}$ gelagert. In gleicher Weise wurden 3 - 4 Nachbarglomeruli präpariert, deren Macula densa nicht perfundiert worden war, und als Kontrollen zur Messung gegeben. Die Reninbestimmung schließlich erfolgte nach der oben ausführlich beschriebenen Methode nach Dahlheim et al.

D) Ergebnisse

Folgende Lösungen wurden bei den Versuchen verwendet:

1. NaCl-Lösung 120 mMol/l + 5.0 g% Indigocarmin.
Gemessen: [Na] = 144 meq/l;
2. Ringerlösung in der Zusammensetzung wie von Schnermann in (94) angegeben.
Gemessen: [Na] = 140 meq/l;
3. LiCl 150 mMol/l.
Gemessen: 298 mosmol/l;
4. NaBr 150 mMol/l.
Gemessen: 150,5 meq/l [Na];
5. Na-Ferrocyanid 35 mMol/l + 125 mMol/l Mannitol.
Gemessen: 276 mosmol/l, 144.0 meq/l [Na];
6. NaCl 150 mMol/l + Amilorid 10^{-4} Mol/l.
7. "Frühdistale Lösung" (Mock early distal tubular fluid), bestehend aus Na 26 meq/l, Urea 35 mMol/l, K 1.5 meq/l.
Gemessen: 88 mosmol/l;
8. Mannitol 300 mMol/l, entsprechend 300 mosmol/l.
9. Cholinchlorid 150 mMol/l.
Gemessen: 265 mosmol/l.
10. Na-Sulfat in der Zusammensetzung wie von Schnermann et al. angegeben (94).

In einer ersten Serie von Versuchen wurde die Reninaktivität bestimmt nach Perfusion eines Nephrons mit Ringerlösung (Natriumkonzentration 140 meq/l. Wie aus Tabelle 1 und Abbildung 18 hervorgeht, konnte in jedem einzelnen Versuch ein Anstieg der Reninaktivität festgestellt werden infolge der Perfusion mit Ringerlösung, verglichen mit den Einzelwerten der Kontrollen bzw. deren Mittelwert. Der Mittelwert des Reningehaltes stieg

nach Perfusion auf 35.7 ng/0.1 ml x h von 13.35 ng/0.1 ml x h bei den Kontrollen.

In der nächsten Serie wurde der Einfluß einer isoosmotischen, elektrolytfreien Mannitollösung auf den Renin-gehalt des JGA eines Nephrons untersucht, das in gleicher Anordnung perfundiert wurde. Dabei konnte kein Anstieg beobachtet werden. Im Gegenteil ist im Ganzen gesehen ein geringer, statistisch nicht signifikanter Abfall des Reningehaltes der perfundierten JGAs zu sehen. Der Mittelwert aller perfundierten JGAs ist mit 12.23 ng/0.1 ml x h etwas niedriger als derjenige der Kontrollen mit 18.89 ng/0.1 ml x h (Abb. 18 und Tabelle 2).

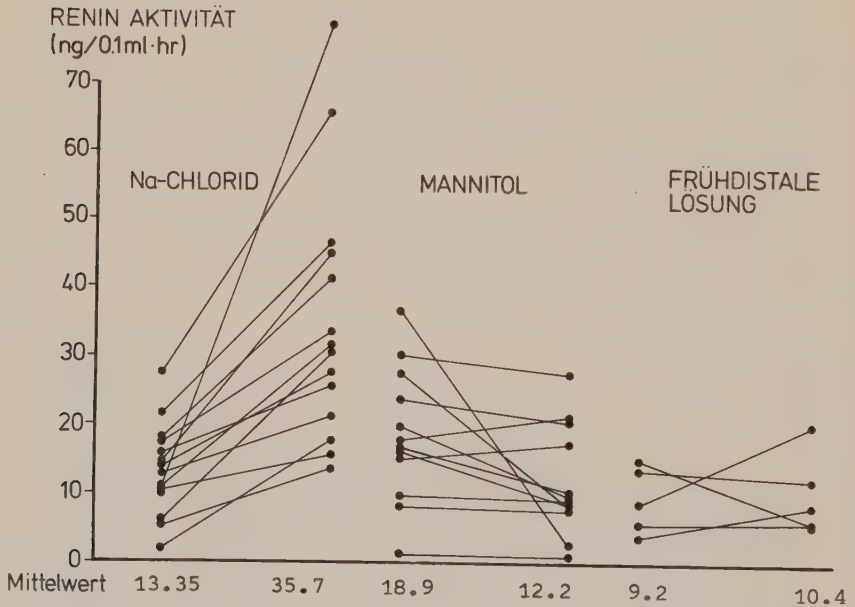


Abb. 18: Ergebnisse schematisch (s. nächste Seite)

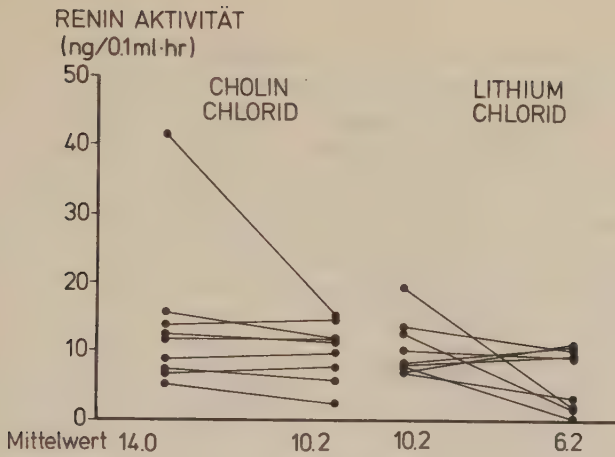


Abb. 19

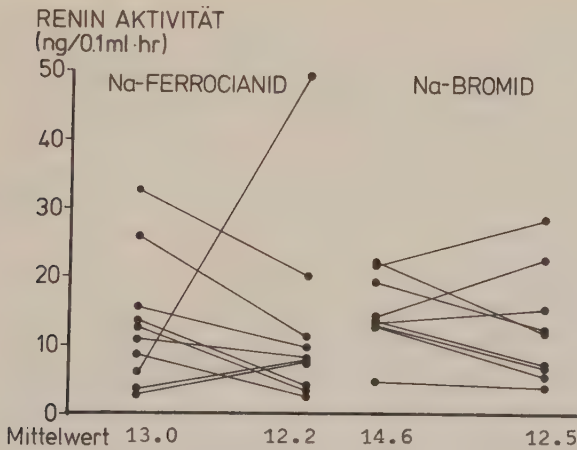


Abb. 20

Abb. 18, 19 und 20: Schematische Darstellung des Verhaltens der Reninaktivität im einzelnen JGA infolge Perfusion des Macula densa-Segments. Die Punkte der Kontrollwerte (links) wurden verbunden mit den entsprechenden Werten nach Perfusion (rechts).

Die nächste Frage war, ob der Austausch eines Ions den gleichen Effekt wie NaCl haben würde. Zunächst wurde das Natrium durch Cholin ersetzt. Wie aus Abbildung 19 und Tabelle 3 hervorgeht, ist mit der Perfusion des distalen Tubulus mit Cholinchlorid keine Reaktion des JGA zu erzielen. Auch hier liegt der Mittelwert nach Perfusion mit 10.2 ng/0.1 ml x h etwas, aber nicht signifikant niedriger als derjenige der Kontrollen mit 13.91 ng/0.1 ml x h.

Wurde das Na^+ durch Lithium⁺ ersetzt, das in manchen Fällen, besonders enzymatischen Reaktionen, wie Natrium fungiert, so konnte ebenfalls keine Reaktion ausgelöst werden. Der Mittelwert nach Perfusion lag mit 6.2 ng/0.1 ml x h etwas unter dem der Kontrollen mit 10.2 ng/0.1 ml x h (siehe Abb. 19 und Tabelle 4).

Die nächste Serie wurde mit Natrium-Sulfat begonnen und mit Natrium-Ferrocyanid weitergeführt. Das Gesamtergebnis zeigt für die perfundierten JGAs 12.2 ng/0.1 ml x h und für die Kontrollen 13.0 ng/0.1 ml x h (Abb. 20 und Tabellen 5 und 6).

Der Zusatz des Diuretikums Amilorid zu einer 140 mMol/l NaCl enthaltenden Lösung in einer Konzentration von 10^{-4} Mol/l hatte zur Folge, daß keine Aktivierung des JGAs erfolgte. Der Mittelwert der perfundierten JGAs ist mit dem der Kontrollen nahezu identisch, 15.4 ng/0.1 ml x h gegenüber 15.6 ng/0.1 ml x h (Abb. 21 und Tabelle 7).

Die Perfusion eines Nephrons mit isotoner NaBr-Lösung konnte den Reningehalt des JGAs nicht erhöhen. Der Unterschied zwischen perfundierten JGAs und Kontrolle war gering, gefunden wurde nach Perfusion 12.3 ng/0.1 ml x h und bei den Kontrollen 14.6 ng/0.1 ml x h (Abb. 20 und Tabelle 8).

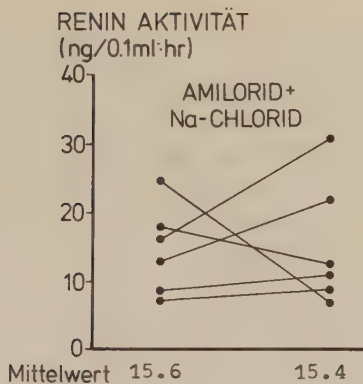


Abb. 21: s. Abb. 18, 19 und 20.

In einer letzten Serie wurde der Einfluß einer "früh-distalen Lösung", die 26 meq/l Na enthielt, auf den Reningehalt des JGAs eines damit perfundierten Nephrons untersucht. Der Mittelwert der Reninaktivität nach Perfusion lag mit 10.43 ng/0.1 ml x h nur gering über dem der Kontrollen mit 9.27 ng/0.1 ml x h (Abb. 18 und Tabelle 9).

Schließlich wurden in einer Serie Ratten verwendet, die anstelle von Leitungswasser seit 5 Tagen vor dem Versuch isotone Kochsalzlösung als Trinkwasser bekommen hatten. Die Perfusionen wurden mit Ringerlösung wie oben angegeben durchgeführt. Es zeigte sich, daß der JGA dieser Tiere nicht mehr stimulierbar war. Die Reninwerte nach Perfusion lagen in etwa im Bereich der Kontrollen, Mittelwert nach Perfusion war 10.37 ng/0.1 ml x h, bei den Kontrollen 19.8 ng/0.1 ml x h (Tabelle 10).

E) Diskussion

Die physiologische Funktion des JGA war in den letzten Jahren im Mittelpunkt des Interesses der Arbeitsgruppe um Thureau gestanden. Zahlreiche Vorarbeiten waren nötig, insbesondere auf enzym-chemischem Gebiet, bis es gelang, in einer direkten Versuchsanordnung die Beziehung zwischen der ionalen Zusammensetzung der Tubulusflüssigkeit im Bereich der Macula densa und dem Reningehalt des damit in Verbindung stehenden JGA nachzuweisen, wie sie 1965 von Thureau et al. postuliert worden war.

Der juxtaglomeruläre Zellkomplex liegt zwischen dem Ende der Henle'schen Schleife und dem Gefäßpol des Glomerulus. Unter dem Gesichtspunkt der Nierenphysiologie gesehen verbindet dieser Zellkomplex die beiden grundlegenden Funktionen der Niere, die energetisch voneinander unabhängig sind:

Die glomeruläre Funktion als hämodynamisches Phänomen, die energetisch von der Leistung des Herzens und damit von dessen Metabolismus abhängt mit der tubulären Funktion, die energetisch an den Metabolismus der Niere gebunden ist.

Die Niere kann ihre normale Funktion nur ausüben, wenn diese beiden Teilfunktionen eines jeden Nephrons miteinander im Gleichgewicht stehen.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Frage, wie der juxtaglomeruläre Zellkomplex zum Gleichgewicht dieser beiden Funktionen beiträgt und welche Rolle das in diesem Zellkomplex lokalisierte Renin-Angiotensin-System bei diesem Phänomen der glomerulo-tubulären Balance spielt.

Mikropunktionsanalysen aus einem frühdistalen Segment, das der Macula densa am nächsten liegt und der Mikropunktion zugänglich ist, haben gezeigt, daß die Natrium-

konzentration der Tubulusflüssigkeit aus diesem Segment unter allen physiologischen Bedingungen im Bereich zwischen 20 und 40 meq/l liegt.

Diese niedrige Natriumkonzentration wird durch aktive Resorption von NaCl bei eingeschränkter Wasserpermeabilität im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife verursacht. Wie die Arbeiten von Cortney (30) und Schnermann (93, 94) zeigen, scheint aufgrund der verminderten Wasserpermeabilität eine Abhängigkeit der Natriumkonzentration am Ende der Henle'schen Schleife von der Harnstromstärke zu bestehen.

Somit führt die Fähigkeit der Henle'schen Schleife, eine Änderung des Harnstroms, der unter sonst konstanten Bedingungen durch die glomeruläre Funktion bestimmt ist, in eine Änderung der Natriumkonzentration im Macula densa-Bereich umzusetzen, die durch die tubuläre Funktion bestimmt ist, zu einem Signal an der Macula densa, das Ausdruck des Gleichgewichts dieser beiden Parameter einer Nephroneneinheit ist. Auf der Basis der Anatomie und Physiologie kann dieses Nephronsegment als ein möglicher Träger eines Rückkoppelungsmechanismus angesehen werden, der das Einzelnephronfiltrat kontrolliert.

Schnermann et al. (94) zeigten quantitativ die Existenz einer solchen Feed-back-Kontrolle des GFR als Basis zur Aufrechterhaltung einer glomerulo-tubulären Balance. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß bei dieser Kontrolle der glomerulo-tubulären Balance das im JGA lokalisierte Renin-Angiotensin-System die Änderungen der GFR verursacht.

In jeder der Versuchsserien wurde unter gleicher Versuchsanordnung ein einzelnes Nephron an einer frühdistalen Stelle punktiert und die Henle'sche Schleife retrograd mit den Testlösungen perfundiert. Anschließend wurde im JGA dieses Nephrons die Reninaktivität bestimmt

und mit derjenigen von JGAs aus der Umgebung, deren Henle'sche Schleifen von originärer Tubulusflüssigkeit durchströmt wurden, verglichen. Da der Reningehalt von Niere zu Niere stark schwankt, was von verschiedenen Voruntersuchern bereits festgestellt worden war (20, 33, 52, 107), ist es stets nur möglich und sinnvoll, Vergleiche innerhalb einer Niere (= eines Versuchs) zu ziehen. Eines der Hauptprobleme liegt in dieser starken Streuung der Kontrollwerte, die sich nur durch die Gabe einer kochsalzreichen Diät vermindern ließe (52). Dies ist im vorliegenden Fall jedoch unmöglich zu verwirklichen, da schon eine geringe Erhöhung in der Kochsalzzufuhr die Reaktion des JGA auf eine Erhöhung der NaCl-Konzentration im Macula densa-Bereich verhindert, wie unten noch gezeigt wird.

NaCl: In einer ersten Serie wurde die Reninaktivität bestimmt nach Perfusion eines Nephrons mit Ringerlösung (Natriumkonzentration 140 meq/l). Wie aus Tabelle 1 bzw. Abbildung 18 hervorgeht, konnte in jedem einzelnen Versuch ein Anstieg der Reninaktivität festgestellt werden infolge der NaCl-Perfusion, verglichen mit den Einzelwerten der Kontrollen bzw. deren Mittelwert, wie er mit dieser Deutlichkeit und Beständigkeit in keiner der folgenden Serien mehr gefunden wurde. Anstiege der Reninaktivität ähnlicher Größenordnung, also etwa um den Faktor 3, wurden von der Arbeitsgruppe um Thurau auch bei postischämischen JGAs festgestellt, die mit Hilfe der Mikrodissektion gewonnen wurden (persönl. Mitteilung, unveröffentlicht).

Mannitol: Die Reninaktivität sank in den JGAs, deren Schleifen mit isoosmotischer Mannitollösung perfundiert wurden, im Vergleich zu den Kontrollwerten leicht ab. Die Tatsache, daß kein signifikanter Abfall gezeigt werden konnte, ist jedoch nicht verwunderlich, da die

ohnehin schon normalerweise niedrige Natriumkonzentration in diesem Bereich nur noch unwesentlich gesenkt werden kann und eine absolut natriumfreie Perfusion aufgrund des transepithelialen Natrium-Influges in das Perfusat nicht möglich ist.

Damit war eindeutig gezeigt, daß eine zwar isotone, aber elektrolytfreie Lösung nicht imstande war, die Reninaktivität des JGA zu erhöhen, wie dies von Guyton (54) bzw. Brown (19) postuliert worden war.

Natrium-Sulfat und Natrium-Ferrocyanid: Zur Frage, ob es allein die Konzentrationserhöhung des Natriums im distalen Tubulus ist, die den Feed-back-Mechanismus auslöst, wurde eine neue Serie mit Natrium-Sulfat begonnen in Anlehnung an die Versuche von Schnermann (94). Da damit jedoch unter unseren Versuchsbedingungen kein eindeutiges Ergebnis zu erzielen war, wurde die Serie unter Verwendung des größeren Anions Ferrocyanid fortgesetzt. Im Gesamtergebnis ist nach Perfusion mit Natrium-Ferrocyanid keine Änderung des Reningehaltes eingetreten. Der Grund für das unklare Ergebnis nach Verwendung von Natrium-Sulfat ist nicht leicht zu finden.

Damit scheint festzustehen, daß es nicht allein die Erhöhung der Natriumkonzentration ist, die den Mechanismus in Gang setzt, sondern daß das Natrium in die Zellen eindringen können muß. Um diese Hypothese zu erhärten, wurde in der nächsten Serie isotone Kochsalzlösung verwendet, der 10^{-4} Mol/l Amilorid zugesetzt war. Das Diuretikum Amilorid ist ein Agens, von dem an der Froschhaut gezeigt worden war, daß es den passiven Eintritt von Natrium in die Zellen verhindert (38). Unter der Annahme einer ähnlichen Wirkung an den Tubuluszellen, was von den Ergebnissen von Duarte et al. (39) unterstützt wird, würde diese Substanz den Eintritt des Natriums über die luminale Membran in die Macula densa-Zelle ver-

hindern. Das Ergebnis zeigt, daß diese Wirkung tatsächlich vorhanden ist, denn es gelingt mit dieser Lösung nicht, die Reninaktivität im JGA zu erhöhen.

NaBr: Das Ergebnis der Perfusion mit NaBr war insofern überraschend, als es nicht gelang, damit den Mechanismus zu stimulieren. Der Unterschied zwischen perfundierten JGAs und Kontrollen war gering.

Diese Daten zeigen, daß das Renin-Angiotensin-System im JGA auf das NaCl im Macula densa-Segment empfindlich ist und daß mit der großen Wahrscheinlichkeit beide Ionen, Na und Cl, für die in vivo-Wirkung notwendig sind. Dies unterscheidet sich von Ergebnissen, die in vitro an Nierenrindenschnitten und isolierten Glomeruli gefunden wurden (55). Ein weiterer Unterschied zwischen in vivo- und in vitro-Stimulation wird durch folgende Beobachtung offensichtlich: Alle JGAs, ob experimentell mit 140 meq/l Natrium perfundiert oder mit tubulärer Flüssigkeit glomerulärer Herkunft, wurden nach der Mikrodissektion mit einer Substratlösung inkubiert, die 140 meq/l Natrium enthielt. Da alle JGAs der gleichen Natriumkonzentration in der Inkubationslösung ausgesetzt waren, muß der Anstieg der Reninaktivität, wie er nach Perfusion der Macula densa mit isotoner Kochsalzlösung gefunden wurde, schon vor der Inkubation erfolgt sein. Es scheint also, daß der Anstieg der Reninfreisetzung aus Rindenschnitten und isolierten Glomeruli, wie er durch einfache Erhöhung der Natriumkonzentration der Badlösung erreicht wird, nicht in direkter Beziehung zu dem(n) Mechanismus(en) steht, der unter in vivo-Bedingungen wirksam ist. Um Verwirrungen zu vermeiden, sollte daher für die Aktivierung von JGA-Renin durch NaCl in der Tubulusflüssigkeit an der Macula densa unter in vivo-Bedingungen der Ausdruck "Macula densa-Faktor" gebraucht werden.

"Frühdistale Lösung": Die Perfusion mit einer Lösung, die 26 meq/l Natrium enthielt, konnte den Renin-Angiotensin-Mechanismus des JGA ebenfalls nicht stimulieren. Der Mittelwert nach Perfusion übersteigt den der Kontrollen nur sehr gering. Daraus folgt, daß unter den Versuchsbedingungen die physiologischen Verhältnisse nicht beeinträchtigt werden und eine Aktivierung des Systems nur erfolgt, wenn die Konzentration des NaCl im Macula densa-Bereich hohe Werte erreicht und das Natrium in die Zellen permeieren kann.

Aus der Vielzahl der bisher genannten Daten wird der Schluß gezogen, daß als Renin-auslösender Faktor unter in vivo-Bedingungen nur die Erhöhung der Konzentration von NaCl, wobei das Natrium und das Chlorid in die Zellen eindringen können muß, in Frage kommt. Ferner wurde gezeigt, daß unter diesen Bedingungen, wie schon früher postuliert, das Renin-Angiotensin-System aktiviert wird und auf der Ebene eines einzelnen Nephrons seine Wirkung entfaltet. Dies scheint mit aller Wahrscheinlichkeit die physiologische Funktion dieses Systems zu sein, daß es jeweils für ein Nephron den tubulo-glomerulären Rückkoppelungsmechanismus vermittelt.

Zur Frage, ob es sich hierbei um eine Neubildung von Renin handelt oder ob in den Granula vorhandenes Renin aktiviert wird, kann ein Befund zitiert werden, der eher für die letztere Annahme spricht. Bei einem Versuch mit distaler Perfusion mit Ringerlösung wurde schon nach knapp 4 min eingefroren und nicht wie üblich nach 20 min. Zu diesem Zeitpunkt war schon eindeutig die Reaktion des perfundierten Nephrons, nämlich das fast völlige Sistieren der Filtration, zu sehen. Bei diesem Versuch wurden folgende Werte gefunden: Für den perfundierten JGA 32.1 ng/0.1 ml x h, für die Kontrollen 5.8, 16.8 und 10.8 ng/0.1 ml x h. Natürlich kann

nicht ausgeschlossen werden, daß dieser Wert noch gestiegen wäre, genauso wie dies auch nach den 20 min nicht sicher ausgeschlossen werden kann, jedoch sehr unwahrscheinlich erscheint. Es scheint also, daß präformierte, aber physiologisch inaktive Moleküle aktiviert werden.

In einer Serie wurde der Versuch unternommen, die Schwankungen der Normalwerte durch leichte Einflußnahme auf die Natriumbilanz der Versuchstiere zu mindern. Dazu bekamen die Ratten anstelle von Leitungswasser 5 Tage lang bis zum Versuch isotone Kochsalzlösung zu trinken. Dabei stellten wir fest, daß diese Ratten durch die übliche distale NaCl-Perfusion nicht mehr stimulierbar waren und daß es auf diese Weise nicht gelungen war, die Kontrollwertschwankungen zu vermindern. Die Reninwerte nach Perfusion lagen in etwa im Bereich der Kontrollen, Mittelwert nach Perfusion war $10.37 \text{ ng}/0.1 \text{ ml} \times \text{h}$, bei den Kontrollen $19.8 \text{ ng}/0.1 \text{ ml} \times \text{h}$. Die Tatsache, daß eine Erhöhung der Salzzufuhr die Stimulierbarkeit vermindert, steht in Übereinstimmung mit den früher von Thureau et al. erhobenen Befunden.

Damit kommt ein neuer, wichtiger Aspekt hinzu. Nicht nur tubuläre Parameter, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, üben einen Einfluß auf das Renin-Angiotensin-System des JGA aus. Auch die extrarenalen Faktoren ECV und Gesamtkörpernatrium scheinen die Aktivität dieses Systems zu beeinflussen. So ist bei salzreichen Tieren die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems des JGA vermindert, in salzarmen Tieren erhöht. Über welche Mechanismen dieser Einfluß ausgeübt wird, bleibt zu erforschen. Diese extrarenale Modulation der Aktivität des Renin-Angiotensin II-Systems des JGA schließt jedoch die Möglichkeit ein, daß das GFR bei konstantem tubulären Stimulus eine Funktion des ECV wird.

F) Tabellen

Tabelle 1: Reninaktivität (ng/0.1 ml x h) in einzelnen JGAs mit und ohne Perfusion des Macula densa-Segments mit Ringerlösung (p 0.001).

1. Stichprobe = nach Perfusion 2. Stichprobe = $\bar{x}$ Kontrollen

Einzelwerte der Kontrollen:

1	5.82	5.67	3.23	6.32
2	2.13	9.87		
3	9.38	10.48		
4	22.4	22.0	8.8	
5	5.8	16.8	10.8	
6	9.6	3.2	19.0	
7	20.8	12.0	9.6	
8	2.8	1.6		
9	25.6	13.6	8.6	
10	19.2	4.8	15.6	
11	27.0	8.7	7.1	27.0
12	5.4	25.2	12.7	
13	18.3	22.3	24.1	
14	34.4	28.4	14.0	33.2
15	5.6	4.8	4.24	1.92

Nr.	1. Stichprobe	2. Stichprobe	Differenz
1	13.750	5.260	8.490
2	30.900	6.000	24.900
3	78.800	9.930	68.870
4	42.000	17.730	24.270
5	32.100	11.130	20.970
6	16.000	10.600	5.400
7	28.000	14.130	13.870
8	18.000	2.200	15.800
9	26.000	15.930	10.070
10	21.600	13.200	8.400
11	34.000	17.450	30.970
12	45.400	14.430	30.970
13	47.200	21.560	25.640
14	66.000	27.450	38.550
15	14.000	4.140	9.860

Tabelle 2: Reninaktivität (ng/0.1 ml x h) in einzelnen JGAs mit und ohne Perfusion des Macula densa-Segments mit Mannitol (p 0.03).

1. Stichprobe = nach Perfusion 2. Stichprobe = $\bar{x}$ Kontrollen

Einzelwerte der Kontrollen:

1	2.4	1.0	1.3
2	18.6	19.6	15.8
3	24.4	17.7	49.7
4	37.0	13.8	32.4
5	12.1	9.9	23.8
6	27.7	20.6	23.4
7	17.0	19.0	14.5
8	6.0	11.0	13.0
9	13.2	14.2	33.0
10	30.0	40.0	41.2
11	17.0	28.4	5.0
12	12.2	5.5	

Nr.	1. Stichprobe	2. Stichprobe	Differenz
1	1.400	1.560	- 0.160
2	21.600	18.000	3.600
3	27.700	30.600	- 2.900
4	8.400	27.730	-19.330
5	17.800	15.260	2.540
6	21.100	23.900	- 2.800
7	10.300	16.830	- 6.530
8	9.600	10.000	- 0.400
9	9.500	20.130	-10.630
10	2.800	37.060	-34.260
11	8.600	16.800	- 8.200
12	8.000	8.850	- 0.850

Tabelle 3: Reninaktivität (ng/0.1 ml x h) in einzelnen JGAs mit und ohne Perfusion des Macula densa-Segments mit Cholin-Chlorid (p 0.15).

1. Stichprobe = nach Perfusion 2. Stichprobe = $\bar{x}$ Kontrollen

Einzelwerte der Kontrollen:

1	15.2	21.0	12.0
2	25.5	55.5	43.5
3	7.1	7.6	7.9
4	7.3	7.7	6.6
5	12.6	11.1	13.7
6	12.7	12.9	11.3
7	10.0	7.0	9.6
8	1.1	10.5	4.4
9	8.0	13.0	21.0

Nr.	1. Stichprobe	2. Stichprobe	Differenz
1	12.000	16.060	- 4.060
2	15.300	41.500	-26.200
3	5.800	7.530	- 1.730
4	7.900	7.200	0.700
5	11.400	12.460	- 1.060
6	12.000	12.300	- 0.300
7	10.000	8.860	1.140
8	2.400	5.330	- 2.930
9	15.000	14.000	1.000

Tabelle 4: Reninaktivität (ng/0.1 ml x h) in einzelnen JGAs mit und ohne Perfusion des Macula densa-Segments mit Lithium-Chlorid (p = 0.1).

1. Stichprobe = nach Perfusion 2. Stichprobe = $\bar{x}$ Kontrollen

Einzelwerte der Kontrollen:

1	1.4	8.6	10.1
2	6.5	15.8	0.83
3	4.6	13.0	6.0
4	13.0	19.0	26.0
5	5.4	8.8	9.7
6	11.0	4.4	5.0
7	11.5	6.2	12.7
8	2.6	26.8	6.3
9	19.0	19.0	2.7

Nr.	1. Stichprobe	2. Stichprobe	Differenz
1	3.100	6.700	- 3.600
2	0.000	7.710	- 7.710
3	9.300	7.860	1.440
4	1.660	19.330	-17.670
5	10.600	14.410	- 3.810
6	10.700	6.800	3.900
7	9.000	10.130	- 1.130
8	1.600	11.900	-10.300
9	10.000	13.560	- 3.560

Tabelle 5: Reninaktivität (ng/0.1 ml x h) in einzelnen JGAs mit und ohne Perfusion des Macula densa-Segments mit Na_2SO_4 (p Ø).

1. Stichprobe = nach Perfusion 2. Stichprobe = $\bar{x}$ Kontrollen

Einzelwerte der Kontrollen:

1	2.8	1.2	10.0
2	32.0	7.8	27.4
3	8.7	6.7	2.0
4	13.0	14.0	4.0

Nr.	1. Stichprobe	2. Stichprobe	Differenz
1	24.200	4.600	19.540
2	6.000	22.400	-16.400
3	24.500	5.800	18.700
4	24.000	10.330	13.670

Tabelle 6: Reninaktivität (ng/0.1 ml x h) in einzelnen JGAs mit und ohne Perfusion des Macula densa-Segments mit Natrium-Ferrocyanid (p 0.15)

1. Stichprobe = nach Perfusion 2. Stichprobe = $\bar{x}$ Kontrollen

Einzelwerte der Kontrollen:

1	17.4	9.0	20.0
2	9.6	20.0	8.1
3	12.0	14.5	14.0
4	8.0	22.0	2.0
5	17.0	61.0	19.4
6	16.2	25.0	36.0
7	8.0	2.5	7.6
8	4.8	10.7	9.6
9	2.0	3.8	4.5
10	2.4	3.1	2.7

Nr.	1. Stichprobe	2. Stichprobe	Differenz
1	9.500	15.460	- 5.960
2	3.300	12.560	- 9.260
3	4.000	13.500	- 9.500
4	8.000	10.660	- 2.660
5	20.000	32.460	-12.460
6	11.000	25.730	-14.730
7	49.200	6.030	43.170
8	2.500	8.367	- 5.867
9	7.800	3.430	4.370
10	7.400	2.730	4.670

Tabelle 7: Reninaktivität (ng/0.1 ml x h) in einzelnen JGAs mit und ohne Perfusion des Macula densa-Segments mit NaCl + Amilorid (p 0.15).

1. Stichprobe = nach Perfusion 2. Stichprobe = $\bar{x}$ Kontrollen

Einzelwerte der Kontrollen:

1	9.6	11.7	5.2
2	21.0	45.0	23.0
3	6.4	7.0	8.6
4	3.7	10.3	24.8
5	28.0	9.6	16.4
6	6.0	10.0	33.0

Nr.	1. Stichprobe	2. Stichprobe	Differenz
1	11.200	8.830	2.370
2	7.000	30.330	-23.330
3	9.000	7.330	1.670
4	21.900	12.930	8.970
5	12.600	18.000	- 5.400
6	31.000	16.330	14.670

Tabelle 8: Reninaktivität (ng/0.1 ml x h) in einzelnen JGAs mit und ohne Perfusion des Macula densa-Segments mit Natriumbromid (p 0.15).

1. Stichprobe = nach Perfusion 2. Stichprobe = $\bar{x}$ Kontrollen

Einzelwerte der Kontrollen:

1	7.0	1.5	3.3	6.5
2	3.3	38.0	24.0	
3	16.0	16.8	22.6	20.0
4	19.0	15.5	25.0	26.0
5	15.8	20.1	12.0	8.0
6	12.5	18.4	6.5	12.2
7	11.5	6.5	18.5	16.0
8	7.6	12.0	11.6	19.0
9	6.5	16.5	18.5	10.0

Nr.	1. Stichprobe	2. Stichprobe	Differenz
1	3.600	4.570	- 0.970
2	11.300	21.760	-10.460
3	12.000	18.850	- 6.850
4	28.000	21.370	6.630
5	22.200	13.970	8.230
6	5.200	12.400	- 7.200
7	15.000	13.120	1.880
8	6.600	12.550	- 5.950
9	7.000	12.870	- 5.870

Tabelle 9: Reninaktivität (ng/0.1 ml x h) in einzelnen JGAs mit und ohne Perfusion des Macula densa-Segments mit Natrium-Chlorid 26 meq/l (p 0.15).

1. Stichprobe = nach Perfusion 2. Stichprobe = $\bar{x}$ Kontrollen

Einzelwerte der Kontrollen:

1	5.0	5.5	9.5	14.0
2	6.0	2.4	2.4	4.4
3	5.2	3.5	9.2	4.9
4	12.0	10.5	18.5	13.0
5	11.0	5.5	18.4	24.5

Nr.	1. Stichprobe	2. Stichprobe	Differenz
1	20.000	8.500	11.500
2	8.160	3.800	4.360
3	6.000	5.710	0.290
4	12.000	13.500	- 1.500
5	6.000	14.850	- 8.850

Tabelle 10: Reninaktivität (ng/0.1 ml x h) in einzelnen JGAs mit und ohne Perfusion des Macula densa-Segments mit Ringerlösung nach salzreicher Diät (0.10 p 0.15).

1. Stichprobe = nach Perfusion 2. Stichprobe = $\bar{x}$ Kontrollen

Einzelwerte der Kontrollen:

1	26.5	27.8	1.4
2	36.6	11.0	7.0
3	11.6	25.1	
4	46.0	44.9	53.0
5	1.4	12.0	
6	13.5	12.0	
7	19.0	19.0	16.3
8	5.4	12.7	7.5
9	26.5	30.0	14.4
10	17.5	13.9	46.0

Nr.	1. Stichprobe	2. Stichprobe	Differenz
1	20.400	18.560	1.840
2	0.500	18.200	-17.700
3	19.600	18.350	1.250
4	13.900	47.960	-34.060
5	1.000	6.700	- 5.700
6	2.800	12.750	- 9.950
7	1.700	18.100	-16.400
8	18.000	8.530	9.470
9	23.700	23.630	0.070
10	2.100	25.800	-23.700

G) Zusammenfassung

Mit Hilfe einer Kombination aus Mikropunktion, Mikrodissektion und Mikroenzymbestimmung wurde die physiologische Funktion des JGA der Ratteniere untersucht. Bei männlichen Wistar-Ratten wurde die linke Niere zur Mikropunktion freigelegt. Dann wurde ein Nephron von einer distalen Punktion aus retrograd perfundiert. Verwendet wurden als Lösungen:

1. Ringerlösung mit einer Natriumkonzentration von 140 meq/l
2. isotone Mannitollösung
3. isotone Lithium-Chloridlösung
4. isotone Cholin-Chloridlösung
5. isotone Natrium-Bromidlösung
6. isotone Natrium-Sulfat- bzw. Natrium-Ferrocyanidlösung mit einer Natriumkonzentration von 140 meq/l
7. isotone Natrium-Chloridlösung mit einem Zusatz von 10^{-4} Mol/l Amilorid
8. fröhdistale Lösung mit einer Natriumkonzentration von 26 meq/l
9. Ringerlösung bei Ratten, die 5 Tage lang natriumreich ernährt worden waren.

Nur im ersten Fall - mit Ringerlösung - war es möglich, den Renin-Angiotensin-Mechanismus zu stimulieren. In allen anderen Fällen gelang dies nicht. Es wird postuliert, daß beide Ionen, Natrium und Chlorid, nötig sind, um den Renin-Angiotensin-Mechanismus auszulösen, wobei das Eindringen dieser Ionen in die Zellen möglich sein muß.

Somit scheint die physiologische Funktion des JGA zu sein, auf der Ebene eines Nephrons den Rückkoppelungsmechanismus zu vermitteln, der die glomerulo-tubuläre Balance erhält.

H) Anhang

1. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Datenverarbeitung der Technischen Universität München. Verwendet wurde dazu der Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon (123) für verbundene Stichproben. Dabei wird festgestellt, ob zwischen den numerischen Werten eines Paares eine Differenz besteht. Ausgehend von einer Nullhypothese, die besagt, daß kein Unterschied besteht, wird diese dann akzeptiert oder verworfen. Die Signifikanzberechnung erfolgt unter Zugrundelegung der nach ihrer numerischen Größe sortierten Differenzen. Es wird festgestellt, ob und in welcher Größe und Richtung die Differenzen von der Nullhypothese abweichen. Daraus wird eine Rangsumme berechnet, die es erlaubt, in einer nach MacCornack (29) modifizierten Tabelle für kleine n das α bzw. 2α zu ermitteln.

In unserem Fall wird der Wert eines perfundierten JGA mit dem Mittelwert der zugehörigen Kontrollen verglichen. Dieses Verfahren scheint aus folgenden Gründen berechtigt und sinnvoll: Erstens erfolgt der Vergleich jeweils auf der Ebene einer Niere, was wegen der sehr unterschiedlichen Normalspiegel des Renins in der Niere sinnvoll ist. Zweitens wird durch die Mittelung der Kontrollen deren Zahlenwert dem Wert des perfundierten JGA gleichgestellt (für die Berechnung). Würde man den Vergleich zwischen dem Perfusionswert und jedem einzelnen Kontrollwert statistisch einwandfrei führen wollen, so müßte man mit einem modifizierten Verfahren nach Friedman arbeiten, das für mehrere verbundene Stichproben geeignet ist. Dabei käme jedoch den Kontrollwerten eine Bedeutung zu, die sie biologisch gesehen nicht besitzen. (Dieser Test eignet sich zum Vergleich mehrerer Werte, die gleiche biologische Bedeutung haben und sich

nur dadurch unterscheiden, daß sie z.B. zu verschiedenen Tageszeiten gewonnen wurden.) Um dem Einwand vorzubeugen, durch die Mittelung der Kontrollen würden deren Schwankungen verschleiert, sei gesagt, daß der hier verwendete Wilcoxon-Test zur Probe für die Werte der Perfusion mit Ringerlösung in der Weise angewandt wurde, daß jeder einzelne Kontrollwert mit dem zugehörigen Wert nach Perfusion verglichen wurde. Da dadurch jedoch die Auswertung mit der oben genannten Tabelle wegen des fälschlicherweise etwa 3fach größeren n nicht mehr möglich ist, wurde als Kriterium für die Signifikanz der mitberechnete Wert der approximierten normalverteilten Testgröße herangezogen, der sich mit steigender Signifikanz erhöht. Als Ergebnis lag diese approximierte Testgröße beim Einzelvergleich noch etwas höher als bei dem verwendeten Vergleich mit den Mittelwerten, zeigte also eine leicht höhere Signifikanz.

2. Schrifttum

- 1) Assaykeen, T.A., W.F. Ganong:
In: Frontiers in Neuroendocrinology, by Martini and Ganong,
Chapter 3, 67-102, Oxford Univ. Press, N.Y. 1971
- 2) Bailie, M.D., F.C. Rector jr., D.W. Seldin:
Angiotensin II arterial and renal venous plasma and
renal lymph in the dog.
J.Clin.Invest. 50, 119-126 (1971)
- 3) Bailie, M.D., R. Loutzenhiser, S. oyer:
Relation of renal hemodynamics to Angiotensin II in
renal hilar lymph of the dog.
Amer.J.Physiol. 222 (5), 1075-1078 (1972)
- 4) Barajas, L., H. Latta:
Structure of the JGA.
Circ.Res. 20 + 21, Suppl. II, 15-27 (1967)
- 5) Barajas, L.:
The ultrastructure of the JGA as disclosed by three
dimensional reconstructions from serial sections.
J.Ultrastructure Res. 33, 116 (1970)
- 6) Barajas, L.:
Renin secretion: An anatomical basis for tubular con-
trol.
Science 172, 485 (1971)
- 7) Barbour, B.H., J.R. Gill, F.C. Bartter:
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 116, 806 (1964)
- 8) Biava, C.G., M. West:
Fine structure of normal human JGA.
Amer.J.Pathol. 49, 679-721 (1966)
- 9) Bing, J., B. Wiberg:
Acta pathol.microbiol.scand. 44, 138 (1958)
- 10) Bing, J., J. Kazimierczak:
Acta pathol.microbiol.scand. 47, 105 (1959)
- 11) Bing, J., J. Kazimierczak:
Acta pathol.microbiol.scand. 50, 1 (1960)
- 12) Bing, J., J. Kazimierczak:
Acta pathol.microbiol.scand. 54, 80 (1961)

- 13) Blaine, E.H., J.O. Davis, R.L. Prewitt:
Evidence for a renal vascular receptor in control of
renin secretion.
Amer.J.Physiol. 220, 6, 1593-1597 (1971)
- 14) Bock, K.D., H.J. Krecke:
Klin.Wschr. 36, 69 (1958)
- 15) Bohle, A.:
Thesis, Heidelberg 1953
- 15a) Bohle, A., I. Walvig:
Beitrag zur vergleichenden Morphologie der epitheloi-
den Zellen der Nierenarteriolen unter besonderer Be-
rücksichtigung der epitheloiden Zellen in den Nieren
von Seewasserrfischen.
Klin.Wschr. 42, 415 (1964)
- 16) Borkowsky, A.J., S.S. Howards, J.H. Laragh:
Amer.J.Physiol. 208, 1067 (1965)
- 17) Boucher, R., J. Menard, J. Genest:
Canad.J.Physiol.Pharmacol. 45, 881 (1967)
- 18) Braun-Menendez, E., J.C. Fasciolo, L.F. Leloir,
J.M. Munoz, A.C. Taquini:
Renal Hypertension, Springfield, III, Thomas 1946
- 19) Brown, J.J., D.L. Davies, A.F. Lever, J.I.S. Robertson:
J.Physiol. (London) 173, 408 (1964)
- 20) Brown, J.J., D.L. Davies, A.F. Lever, R.A. Parker,
I.A.S. Robertson:
The assay of renin: Single glomeruli in the normal
rabbit and the appearance of the JGA.
J.Physiol. (London) 176, 418 (1965)
- 21) Brown et al.:
Clin.Sci. 30, 223-225 (1966)
- 22) Brubacher, E.S., A.J. Vander:
Sodium deprivation and renin secretion in unanesthe-
tized dogs.
Amer.J.Physiol. 214 (1), 15-21 (1968)
- 23) Bunag, R.D., I.H. Page, J.W. McCubbin:
Neural stimulation of renin release.
Circ.Res. 19, 801-858 (1966)

- 24) Bunag, R.D., I.H. Page, J.W. McCubbin:
Influence of dietary sodium on stimuli causing renin release.
Amer.J.Physiol. 211 (6), 1383-1386 (1966)
- 25) De Champlain, J., J. Genest, R. Veyrat, R. Boucher:
Factors controlling renin in man.
Arch.Intern.Med. 117, 355-363 (1966)
- 26) De Champlain, J., J. Genest, R. Veyrat, R. Boucher:
Factors controlling renin in man.
Trans.Ass.Amer.Physicians 78, 135-157 (1968)
- 27) Cook, W.F., D.B. Gordon, W.S. Peart:
J.Physiol. (London) 135, 46 P (1956)
- 28) Cook, W.F., G.W. Pickering:
J.Physiol. (London) 149, 526 (1959)
- 29) McCornack, R.L.:
Extended tables of the Wilcoxon matched pair signed rank statistic.
J.Amer.Statist.Ass. 60, 864-871 (1965)
- 30) Cortney, M.A., W. Nagel, K. Thurau:
A micropuncture study of the relationship between the flow-rate through the loop of Henle and sodium concentration in the early distal tubule.
Pflügers Arch. 287, 286-295 (1965)
- 31) Davis, J.O., J. Urquhart, J.T. Higgins:
Renin, angiotensin and aldosterone in experimental secondary hyperaldosteronism.
Canad.Med.Ass.J. 113, 932-936 (1964)
- 32) Davis, J.O.:
Aldosterone and angiotensin.
J.Amer.Med.Ass. 188, 1062 (1964)
- 33) Dahlheim, H., P. Granger, K. Thurau:
A sensitive method for determination of renin activity in the single JGA of the rat kidney.
Pflügers Arch. 321, 303-315 (1970)
- 34) Deetjen, P., K. Kramer:
Die Abhängigkeit des O_2 -Verbrauchs der Niere von der Na-Rückresorption.
Pflügers Arch. 287, 286 (1966)

- 35) Dengler, H.J., H.J. Krecke, J. Busch:
Klin.Wschr. 43, 300 (1965)
- 36) Devenyi, J., G. Dauda, J. Szabo:
Juxtaglomerular index and activity of the renin-
angiotensin system.
Path.Europ. 6, Nr. 1, 19 (1971)
- 37) Divry, A.:
The mechanism of the hypertensive action of the kidney.
Arch.Int.Physiol. 59, 211-232 (1957)
- 38) Dörge, A., W. Nagel:
Effect of amiloride on sodium transport in frog skin.
Pflügers Arch. 321, 91 (1970)
- 39) Duarte, C.J., F. Chomety, J. Giebisch:
Effect of amiloride, ouabain and furosemide on distal
tubular function in the rat.
Amer.J.Physiol. 221, 632 (1971)
- 40) Dunihue, F.W., B.H. Candon:
Histologic changes in the renal arterioles of hyper-
tensive rabbits.
Arch.Pathol. 29, 777 (1940)
- 41) Eckert, H.:
Exp.Pathol. 6, 50 (1972)
- 42) Friedman, H., A. Kaplan:
J.Exp.Med. 75, 127 (1942)
- 43) Friedman, H., A. Kaplan:
J.Exp.Med. 77, 65 (1943)
- 44) Gavras, H., et al.
Renin of single deep and superficial glomeruli of
rabbits.
Clin.Sci. 38, 409-414 (1970)
- 45) Goldblatt, H.:
Experimental renal hypertension. Mechanism of product-
ion and maintenance.
Circulation 17, 642-647 (1958)
- 46) Goormaghtigh, N.:
Arch.Biol. 4, 43 (1932)
- 47) Goormaghtigh, N.:
Compt.rend.soc.biol. 124, 293 (1937)

- 48) Goormaghtigh, N.:
Existence of an endocrine gland in the media of the
renal arteries.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 42, 688 (1939)
- 49) Goormaghtigh, N.:
Librairie Fonteyn, Louvain 1944
- 50) Goormaghtigh, N.:
J.Pathol.Bacteriol. 57, 392 (1945)
- 51) Govaerts, P., A. Verniory:
Rev.Belg.de Pathol. 18, 399 (1948)
- 52) Granger, P., H. Dahlheim, K. Thureau:
Enzyme activities of single JGAs in the rat kidney.
Kidney Int. 1, 78-88 (1972)
- 53) Gross, F.:
Adrenocortical function and renal pressor mechanisms.
In: Reubi, Bock und Cottier - Essential hypertension,
Berlin 1960
- 54) Guyton, A.C., J.B. Langstone, G. Navar:
Circ.Res. 15, Suppl. I, 187 (1964)
- 55) Hammersen, G., K.P. Karsunsky, J. Fischinger,
J. Rosenthal, R. Taugner:
Der Einfluß der Na-Konzentration auf die Reninabgabe
aus Nierenrindenschnitten und isolierten Glomeruli.
Pflügers Arch. 328, 344 (1971)
- 56) Hartroft, P.M.:
Studies on renal juxtaglomerular cells. III. The effect
of experimental renal disease and hypertension in the
rat.
J.Exp.Med. 105, 501 (1957)
- 57) Hartroft, P.M., R. Edelman:
Renal juxtaglomerular cells in Na-deficiency.
In: Meyer and Fuchs - Edema, Philadelphia 1960
- 58) Hartroft, P.M., R. Edelman:
Localisation of renin in juxtaglomerular cells of rabbit
and dog through the use of fluorescent antibody tech-
nique.
Circ.Res. 9, 1069 (1961)

- 59) Hartroft, P.M., L.E. Sutherland, W.S. Hartroft:
Juxtaglomerular cells as the source of renin. Further
studies with the fluorescent antibody technique and
the effect of passive transfer of antirenin.
Canad.Med.Assoc.J. 90, 163 (1964)
- 60) Hartroft, P.M.:
Electron microscopy of nerve endings associated with
juxtaglomerular cells and macula densa.
Lab.Invest. 15, 1127-1128 (1966)
- 61) Healy, J.K., C. Barcena, J.M.B. O'Connel, J.E. Schreiner:
Amer.J.Physiol. 208, 1093 (1965)
- 62) Hedeland, H., J.F. Dymling, B. Hökfelt:
Catecholamines, renin and aldosterone in postural
hypotension.
Acta Endocrinol. 62, 399-410 (1969)
- 63) Horster, M., W. Nagel, J. Schnermann, K. Thureau:
Zur Frage einer direkten Angiotensinwirkung auf die
Na-Resorption im proximalen Tubulus und in der Henle'
schen Schleife der Rattenniere.
Pflügers Arch. 292, 118-128 (1966)
- 64) Horster, M., K. Thureau:
Micropuncture studies on the filtration rate of single
superficial and juxtamedullary glomeruli in the rat
kidney.
Pflügers Arch. 301, 162-168 (1968)
- 65) Huidobro, F., M. Braun-Menendez:
The secretion of renin by the intact kidney.
Amer.J.Physiol. 137, 47-55 (1942)
- 66) Kaplan, A., H. Friedman:
J.Exp.Med. 76, 307 (1942)
- 67) Kauffmann, W., F. Bayless:
Amer.J.Pathol. 17, 620 (1941)
- 68) Kohlstaedt, H.G., I.H. Page:
Liberation of renin by perfusion of kidneys following
reduction in pulse pressure.
J.Exp.Med. 72, 201-216 (1940)
- 69) Landwehr, D.M., J. Schnermann, R.M. Klose, G. Giebisch:
Amer.J.Physiol. 1968
- 70) Langford, H.G., G.W. Pickering:
J.Physiol. (London) 177, 161 (1965)

- 71) Laragh, J.H., P.J. Cannon, C.J. Bentzel, A.M. Siczinsky, J.I. Meltzer:
Angiotensin II, norepinephrine, and renal transport of electrolytes and water in normal man and in cirrhosis with ascites.
J.Clin.Invest. 42, 1179 (1963)
- 72) Lassen, N.A., O. Munck, J.H. Thaysen:
Oxygen consumption and sodium reabsorption in the kidney.
Acta physiol.scand. 51, 371 (1961)
- 73) Lever, A.F., W.S. Peart:
Renin and angiotensin-like activity in renal lymph.
J.Physiol. (London) 160, 548 (1962)
- 74) Levitin, H., W.B. Lehmann, J. Pigeon, Y. Warren, I.S. Godenberg:
J.Clin.Invest. 42, 951 (1965)
- 75) Loeffler, J.R., J.R. Stockigt, W.F. Ganong:
Effect of α - and β -adrenergic blocking agents on the increase in renin secretion produced by stimulation of the renal nerves.
Neuroendocrinol. 10, 129-138 (1972)
- 76) Laragh, S.H., P.J. Cannon, R.P. Ames, A.M. Siczinsky, C.J. Bentzel, J.I. Meltzer:
Angiotensin II, and renal sodium transport: Natriuresis and diuresis patients with cirrhosis and ascites.
J.Clin.Invest. 41, 1375 (1962)
- 77) Maebashi, M., Y. Miura, K. Yoshinaga:
Plasma renin activity in pheochromozytoma.
Japan.Circ.J. 32, 1427-1432 (1968)
- 78) Maebashi, M., Y. Miura, K. Yoshinaga:
Suppressive effect of potassium on renin release.
Japan.Circ.J. 32, 1265-1268 (1968)
- 79) Malvin, R.L., W.S. Wilde, A.J. Vander, L.P. Sullivan:
Amer.J.Physiol. 195, 549 (1958)
- 80) Menard, J., K.J. Catt:
Measurement of renin activity, concentration and substrate in rat plasma by radioimmunoassay of angiotensin I.
Endocrinology 90, 422 (1972)
- 81) Meyer, P.:
Thesis, Zürich 1950

- 81a) Mizogami, S., M. Oguri, H. Sokabe, H. Hishimura:
Presence of renin in the glomerular and aglomerular
kidney of marine teleosts.
Amer.J.Physiol. 215, 991 (1968)
- 82) Nagel, W., J. Schnermann, M.A. Cortney, K. Thureau:
Die Beeinflussung der fröhdistalen Na-Konzentration in
der Rattenniere durch Änderung des Harnstromvolumens
und der Angiotensinkonzentration im Harn der Henle'
schen Schleife.
IV Symp.Ges.Nephrol., Springer Berlin, New York 1966,
S. 531
- 83) Ng, K.K.F., J.R. Vane:
Fate of angiotensin I in the circulation.
Nature 218, 144-150 (1968)
- 84) Nairn, R.C., K.B. Fraser, C.S. Chadwick:
Brit.J.Exp.Pathol. 4, 155 (1959)
- 85) Oberling, C.:
Compt.rend.Acad.sci., Paris 1927, 184
- 86) Otsuka, K., T.A. Assaykeen, A. Goldfien, W.F. Ganong:
The effect of hypoglycemia on plasma renin activity
in dogs.
Endocrinology 87, 1306-1317 (1970)
- 87) Page, I.H., F.H. Bumpus:
Angiotensin.
Physiol.Rev. 41, 331-390 (1961)
- 88) Peters, J.:
Proc.Soc.Exp.Biol. (N.Y.) 112, 771 (1963)
- 89) Robertson, A.L. jr., R.R. Smeby, F.H. Bumpus, I.H. Page:
Production of renin by juxtaglomerular cells in vitro.
Circ.Res. 18, 2, Suppl. I, 131-143 (1966)
- 90) Ruyter, J.H.C.:
Z.Zellforsch. 2 (1925)
- 91) Schloß, G.:
Acta anat. (Basel) 1, 365-410 (1945/6)
- 92) Schmid, H.E. jr., L.A. Graham:
Circ.Res. 11, 853 (1962)
- 93) Schnermann, J., W. Nagel, K. Thureau:
Die fröhdistale Na-Konzentration in Rattennnieren nach
renaler Ischämie und hämorrhagischer Hypotension.
Pflügers Arch. 287, 296-310 (1966)

- 94) Schnermann, J., F.S. Wright, J.M. Davis. W. v. Stackelberg, G. Grill:
Regulation of superficial nephron filtration rate by tubulo-glomerular feedback.
Pflügers Arch. 318, 147-175 (1970)
- 95) Schröder, R., C. Meyer-Burgedorff, D. Rott, O. Brahms:
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Pathol.Pharmakol. 240, 285 (1961)
- 96) Schröder, R.:
Klin.Wschr. 41, 620 (1963)
- 97) Selye, H., H. Stoma:
J.Urol. 56, 399 (1946)
- 98) Skinner, S.J., J.W. McCubbin, I.H. Page:
Renal baroreceptor control of renin secretion.
Science 141, 814-816 (1963)
- 99) Skinner, S.J., J.W. McCubbin, I.H. Page:
Control of renin secretion.
Circ.Res. 15, 64-76 (1964)
- 100) Skornik, O.A., A.C. Paladini:
Angiotensin blood levels in hemorrhagic hypotension and other related conditions.
Amer.J.Physiol. 206, 553-556 (1964)
- 100a) Sokabe, H., S. Mizogami, A. Sato:
Role of renin in adaption to sea water in euryhaline fishes.
Japan.J.Pharmacol. 18, 332 (1968)
- 101) Taquini, A.C., P. Blaquier, A.C. Taquini, jr.:
On the production and role of renin.
Canad.Med.Ass.J. 90, 210-213 (1964)
- 102) Taylor, M.G., E. Ullmann:
J.Physiol. (London) 157, 38 (1961)
- 103) Thurau, K.:
Renal hemodynamics.
Amer.J.Med. 36, 698 (1964)
- 104) Thurau, K.:
Fundamentals on renal circulation.
In: Proc. 2nd Int.Congr.Nephrol., Excerpta Medica (Amsterdam), Congr.Ser.No. 78, 51 (1964)

- 105) Thureau, K., J. Schnermann:
Die Na-Konzentration an den Macula densa-Zellen als
regulierender Faktor für das GFR.
Klin.Wschr. 43. Jhrg., Heft 8, 410-413 (1965)
- 106) Thureau, K.:
Die intrarenale Rolle des Renin-Angiotensin-Systems
für die Regulation des GFR und die Na-Ausscheidung.
IV Symp.Ges.Nephrol., Springer Berlin, Heidelberg,
New York 1966, S. 75 ff.
- 107) Thureau, K., H. Dahlheim, P. Granger:
On the local formation of angiotensin at the site of
the juxtaglomerular apparatus.
Proc. 4th Int.Congr.Nephrol. Stockholm 1969, Vol. 2,
S. 24-30, Karger Basel, Mailand, New York 1970
- 108) Tobian, L., A. Toumboulion, J. Janacek:
J.Clin.Invest. 38, 605 (1957)
- 109) Tobian, L., J. Thompson, J. Janacek:
The granulation of JGA cells in renal hypertension,
DOCA hypertension, adrenal degeneration hypertension
and adrenal insufficiency.
J.Clin.Invest. 37, 660 (1958)
- 110) Tobian, L.:
Interrelationship of electrolytes, juxtaglomerular
cells and hypertension.
Physiol.Rev. 40, 280 (1960)
- 111) Tobian, L., J. Janacek, J. Foker, D. Ferreira:
Effect of chlorothiazid on renal juxtaglomerular cells
and tissue electrolytes.
Amer.J.Physiol. 202 (5), 905-908 (1962)
- 112) Tobian, L.:
Relationship of JGA to renin and angiotensin.
Circulation 25, 189-192 (1962)
- 113) Tobian, L., M. Brandes, J. Maney:
The effect of unilateral renal denervation on the
secretion of renin.
Federation Proc. 24, 405 (1965)
- 114) Tørnblom, N.:
Act.med.scand. 159, 369 (1957)

- 115) Ueda, H., H. Yasuda, Y. Tabatake, T. Iizuka, M. Iizuka, M. Iori, M. Yamamoto, M. Sakamoto:
The mechanism of increased renin secretion caused by isoproterenol and norepinephrine.
Japan.Circ.J. 32, 1863-1864 (1968)
- 116) Urquhart, J., J.O. Davis, J.T. Higgins:
Amer.J.Physiol. 205, 1241 (1963)
- 117) Vander, A.J., R. Miller:
Control of renin secretion in the anesthetized dog.
Amer.J.Physiol. 207, 537-546 (1964)
- 118) Vander, A.J.:
Effect of catecholamines and the renal nerves on renin secretion in the anesthetized dog.
Amer.J.Physiol. 209, 659-662 (1965)
- 119) Vander, A.J.:
Renin secretion during Mannitol diuresis and ureteral occlusion.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 128, 518 (1968)
- 120) Veyrat, R., H.R. Brunner, A. Grandchamp, A.F. Muller:
Inhibition of renin by potassium in man.
Acta Endocrinol., Suppl. 119, 86 (1967)
- 121) Wägermark, J., U. Ungerstedt, A. Ljungqvist:
Sympathetic innervation of the juxtaglomerular cells of the kidney.
Circ.Res. 22, 149-153 (1968)
- 122) Wathen, R.L., W.S. Kingsbury, D.A. Stouder, E.G. Schneider, H.H. Rosstorfer:
Effect of infusion of catecholamines and angiotensin II on renin release in anesthetized dogs.
Amer.J.Physiol. 209, 1012-1024 (1965)
- 123) Wilcoxon, F.:
Some rapid approximate statistical procedures.
Stamford, Conn.: American Cyanamid Co., 1949
- 124) Windhager, E.E., G. Giebisch:
Micropuncture study of the renal tubular transfer of sodium chloride in the rat.
Amer.J.Physiol. 200, 581 (1961)
- 125) Yoshimura, F., A. Aegishi:
Amer.J.Physiol. 178, 251 (1954)
- 126) Zimmermann, K.W.:
Z.Mikroskop.anat.Forsch. S. 32 (1933)

Herrn Prof.Dr. Klaus Thureau danke ich für die Überlassung des Themas, die vielseitigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Labor und das stete Interesse an der Durchführung der Untersuchungen.

Herrn Privatdozent Dr. Dahlheim danke ich für die Möglichkeit, die Reninbestimmungen in seinem Labor durchführen zu können, sowie Frau E. Schmidmeier für die gewissenhafte Ausführung der Messungen.

Herrn Dr. M. Wahl danke ich für die stete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche, insbesondere der Mikrodissektion.

Mein besonderer Dank gilt Fräulein Ch. Jenke für ihre Freundlichkeit, die vorliegende Arbeit zu schreiben.

- . . . -

Lebenslauf

Am 28. Oktober 1947 wurde ich als zweites Kind des Arztes Dr. Alfons Grüner und seiner Ehefrau Vera, geb. Knaute, in Bayreuth geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Neusorg. 1958 trat ich in das Gymnasium in Marktredwitz ein und legte dort im Juni 1967 die neusprachliche Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1967/68 begann ich das Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

1968 bzw. 1970 legte ich die naturwissenschaftliche bzw. ärztliche Vorprüfung in München ab.

Während der Zeit meines klinischen Studiums war ich als Doktorand am Physiologischen Institut der Universität bei Herrn Professor Dr. K. Thureau tätig.

Im Oktober 1970 heiratete ich die Medizinstudentin Jutta Lyssack.

Derzeit bin ich als Medizinalassistent tätig.

